

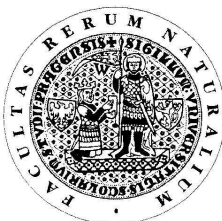
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Michaela Slušná

STANOVENÍ TĚKAVÝCH IZOPRENOIDŮ JAKO  
MARKERŮ VLIVU VODNÍHO STRESU NA REZISTENCI  
SMRKU VŮČI KŮROVCŮM

Determination of volatile isoprenoids as water stress  
markers of spruce resistance against bark beetle

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Praha 2012

Tato diplomová práce byla vypracována na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. v Praze ve spolupráci s ČZU v Praze v období říjen 2010 až květen 2012 a vznikla v souvislosti s řešením výzkumných záměrů: RVO - 61388963, FRVŠ - 2954/G4, CIGA - 3109, NAZV - QH81136.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením RNDr. Blanky Kalinové, CSc. a konzultanta RNDr. Radomíra Čabaly, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR či ČZU, je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne 17.5.2012

.....

podpis

## Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za umožnění věnovat se mé diplomové práci na ÚOCHB AV ČR a RNDr. Blance Kalinové, CSc. za její cenné rady a za seznámení s technikami GC×GC-TOFMS a GC-EAD. Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Radce Břízové, za získané dovednosti, podporu a trpělivost, bez které by tato práce nevznikla. Mé díky patří i Jarmile Titzenthalerové za zasvěcení do práce s elektroantenografií a naměření EAD záznamů. Dále děkuji Ing. Lence Zajíčkové za provedení odběrů vzorků, zasvěcení do fyziologické problematiky a poskytnutí dat z měření fyziologických parametrů. Za pomoc při statistickém zpracování výsledků bych ráda poděkovala RNDr. Alešovi Tomčalovi, PhD.

Ráda bych poděkovala své rodině a svým nejbližším za trpělivost, finanční a morální podporu při mých studiích.

## Abstrakt

Izoprenoidy tvoří důležitou složku pryskyřice a jsou součástí konstitutivní obrany jehličnanů proti herbivorům a patogenům. Sucho má velký vliv na fyziologii a odolnost stromu, protože ovlivňuje tlak pryskyřice v pryskyřičných kanálcích, a tím i schopnost stromů zabránit napadení efektivním výronem pryskyřice. Soudí se, že sucho také ovlivňuje složení emitovaných těkavých látek.

Smrk ztepilý, *Picea abies*, je převažujícím druhem produkčních lesů v oblasti mírného pásma. Lýkožrout smrkový, *Ips typographus*, je v těchto lesích klíčový škůdce. Obecně platí, že pionýrský sameček využívá těkavé látky produkované stromem k orientaci pro výběr vhodného stromu ke kolonizaci. Těkavé látky navíc zesilují účinek agregačního feromonu lýkožrouta.

Diplomová práce se zabývá studiem vlivu sucha na produkci a změnu složení pryskyřice smrků starých 80-100 let. Použitím tykadla lýkožrouta *I. typographus*, jako biologického detektoru, jsme studovali složky pryskyřice, které jsou lýkožroutem vnímány, a díky tomu mají potenciál ovlivňovat rozhodování lýkožroutů o výběru hostitelského stromu.

Analýza těkavých složek pryskyřice byla provedena pomocí dvojrozměrné plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC×GC-TOFMS). Analytická data byla porovnávána běžnými statistickými metodami i vícerozměrnou analýzou, která dokáže postihnout komplexní změny ve složení vzorků. Biologická aktivita těkavých látek pryskyřice byla zjišťována pomocí plynové chromatografie spojené s elektroantennografickou detekcí (GC-FID-EAD).

Bylo identifikováno 18 monoterpenů a 19 seskviterpenů. Kvalitativní i kvantitativní zastoupení jednotlivých typů bylo u suchem stresovaných a kontrolních stromů stejné. Analýzy GC-EAD-FID odhalily, že ze všech těkavých látek přítomných v pryskyřici je jen 11 antenálně aktivních, a tudíž potenciál ovlivnit chování kůrovců má pravděpodobně jen relativně malá část identifikovaných látek.

**Klíčová slova:** *Ips typographus*, *Picea abies*, terpeny, GC×GC-TOFMS, GC-EAD, vodní stres

## Abstract

Isoprenoids are important components of conifer resin and represent an important part of constituted defence system against herbivores and pathogens. Drought is one of the most important factors that influences the tree physiology and resistance. Due to decreased turgor of resin canal cells, the water insufficiency affects the pressure of the resin and thereby the ability of trees to physically prevent pathogen or herbivore invasion by effective outpouring of the resin. In addition, drought can also change the resin composition and thus can influence the quality of volatiles emitted by the tree.

The Norway spruce, *Picea abies*, is the predominant species of production forests in moderate climate zone. Bark beetles, *Ips typographus*, represent the most important pest species of spruce. In general, pioneer bark beetles use host volatiles to orient themselves toward the tree suitable for colonization and in many species host volatiles synergize bark beetle aggregation pheromones. Thus the host volatile composition could affect significantly host colonization.

This diploma thesis studied the influence of drought on the production and composition of isoprenoid volatile organic compounds in 80 – 100 years old spruce trees. Using *I. typographus* antennae as biological detectors, we also studied which resin substances are perceived by *I. typographus* beetles and thus have the potential to influence their behavior during orientation toward the host tree. Analysis of volatile components was performed using two-dimensional gas chromatography with mass spectroscopy (GC×GC-TOFMS). The analytical data were compared with conventional statistical methods and multifactorial analysis. Biological activity of volatile resin was determined by gas chromatography combined with electroantennographic detection (GC-FID-EAD). We identified 18 monoterpenes and 19 sesquiterpenes. The qualitative and quantitative parameters of analyzed samples from stressed trees and controls were similar. Analyses of GC-FID-EAD revealed that from all of the volatile substances identified in the resin, only 11 were antennally active. These compounds possess the potential to influence the orientation of *I. typographus* bark beetles to non-stressed trees.

**Key words:** *Ips typographus*, *Picea abies*, terpenes, GC×GC-TOFMS, GC-EAD, water stress

# Obsah

Prohlášení.....	2
Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Obsah .....	6
Seznam zkratk a symbolů .....	9
1 Úvod.....	11
2 Současný stav řešené problematiky .....	12
2.1 Chemická ekologie .....	12
2.2 Smrk ztepilý.....	13
2.2.1 Taxonomické zařazení .....	14
2.2.2 Výskyt.....	14
2.3 Obrana smrku proti patogenům a predátorům .....	15
2.3.1 Konstitutivní obrana .....	15
2.3.2 Indukovaná obrana.....	15
2.4 Stres a druhy stresu .....	15
2.4.1 Vodní stres .....	16
2.4.2 Vliv vodního stresu na produkci těkavých rostlinných látek.....	17
2.5 Lýkožrout smrkový.....	19
2.5.1 Taxonomické zařazení .....	19
2.5.2 Vzhled.....	20
2.5.3 Rozšíření .....	20
2.5.4 Životní cyklus .....	20
2.5.5 Přirození nepřátelé .....	22
2.5.6 Metody obrany lesa proti kůrovci.....	22

2.6 Metody analýzy přírodních látek .....	24
2.6.1 Metody izolace vzorků semiochemikálií .....	24
2.6.2 Metody analýzy vzorků .....	26
2.6.3 Vícerozměrná analýza (analýza hlavních komponent – PCA) .....	30
2.6.4 Metody měření vodního hospodaření stromů .....	30
3 Experimentální část.....	32
3.1 Chemikálie .....	32
3.2 Přístroje a vybavení .....	32
3.2.1 GC-EAD-FID.....	32
3.2.2 GC×GC-TOFMS .....	33
3.2.3 Další materiál .....	33
3.3 Software .....	34
3.3.1 Zpracování a vizualizace dat.....	34
3.3.2 Statistická analýza a grafická vizualizace výsledků .....	34
3.4 Terénní pokusy .....	34
3.4.1 Označení ploch .....	36
3.5 Odběr vzorků ze stromů.....	36
3.5.1 Odběr vzorků v roce 2010 .....	36
3.5.2 Odběr vzorků v roce 2011 .....	37
3.6 Zpracování vzorků ze stromů .....	37
3.7 Odběr a zpracování vzorku z lapáku.....	37
3.8 GC×GC-TOFMS analýza .....	38
3.9 GC-EAD-FID analýza .....	38
4 Výsledky .....	40
4.1 Celkový obsah identifikovaných látek ve vzorcích .....	40
4.2 Identifikované látky .....	43

4.3 Identifikace antenálně aktivních látek .....	46
4.4 Antenálně aktivní látky identifikované v lapáku .....	50
4.5 Kvantitativní analýza látek odebraných v letech 2010 a 2011 .....	51
4.6 Přehled identifikovaných látek z let 2010 a 2011 .....	54
4.7 Zpracování dat vícerozměrnou analýzou .....	69
5 Diskuze .....	70
6 Závěr .....	73
Seznam použité literatury .....	74
Přílohy.....	82



## Seznam zkratk a symbolů

BVOC	biogenní těkavé organické sloučeniny
Da	dalton
č.	číslo
e	elementární náboj
EAD	antenální detektor
EAG	elektroantenografie
<i>et al.</i>	kolektiv
FID	plamenově ionizační detektor
GC×GC	dvourozměrná plynová chromatografie
GC×GC-MS	dvourozměrná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GC-EAD	plynová chromatografie s elektroantenální detekcí
GC-FTIR	plynová chromatografie s detekcí pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
$I_R$	retenční index
KP1	kontrolní plocha 1
KP2	kontrolní plocha 2
$L$	délka driftové zóny
L.	Linné
m	hmotnost
$m/z$	relativní molekulová hmotnost / náboj
MS	hmotnostní detektor
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	nukleární magnetická rezonance
p.a.	stupeň čistoty ( <i>per analysis</i> - pro analýzu)
P1	experimentální plocha 1
P2	experimentální plocha 2
PCA	analýza hlavních komponent
RT	retenční čas
SPME	mikroextrakce pevnou fází
SRM	sekundární rostlinné metabolity

$t$	čas
TOF	průletový analyzátor
$U$	urychlovač napětí
$z$	náboj

# 1 Úvod

Smrk ztepilý (*Picea abies*), hojně se vyskytující jehličnan v České republice, je hostitelskou rostlinou pro lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*). V normálních populačních hustotách lýkožrouti obvykle napadají padlé stromy a stromy oslabené. Při přemnožení však masivně napadají i zdravé jedince.

Obecně je přijímán názor, že lýkožrouti vyhledávají hostitelský strom na dálku pomocí primárních rostlinných atraktantů (biogenní těkavé organické látky, BVOC) a že vodní stres zvyšuje predispozici smrku k napadení lýkožrouty. O tom, jakým způsobem sucho ovlivňuje složení pryskyřice vzrostlých stromů, není mnoho známo. Rovněž v otázce spojené s vyhledáváním hostitelských stromů lýkožroutem *I. typographus* panují rozpory. V minulosti bylo zjištěno, že *I. typographus* je hlavními terpenickými látkami smrku atrahován (lákán) jen nepatrně [1], a že tyto látky nezvyšují atraktivitu agregačního feromonu *I. typographus*. [2] To vedlo k závěru, že *I. typographus* hledá vhodný strom ke kolonizaci náhodně během dispersního letu po vylíhnutí. Zastánci teorie náhodného výběru soudí, že během odpočinkových period disperzního letu mohou lýkožrouti navštívit i několik potenciálně vhodných hostitelských stromů a vyhodnotit jejich vhodnost pro kolonizaci na základě blíže nespecifikovaných chemických informací [1]. Pro alternativu, že lýkožrouti jsou schopni se orientovat na základě rostlinných těkavých látek, svědčí lesníky dlouhodobě a rutinně používaná technika monitorování a kontroly škůdce v porostu pomocí tzv. lapáků, což jsou pokácené mírně zavadlé stromy. Tyto lapáky jsou pro lýkožrouty velice atraktivní a v průběhu disperzního letu obvykle přilákají velké množství jedinců, kteří tam zakládají novou generaci. Po zavrtání lýkožroutů jsou lapáky z porostu i s novou generací odstraněny. Pomocí elektrofyziologických experimentů zaměřených na identifikaci potenciálně atraktivních látek pryskyřice pro *I. typographus* [3] bylo v minulosti zjištěno, že lýkožrouti mají na tykadlech receptory pro vnímání mnoha smrkových těkavých látek a to nejen pro hlavní, ale i minoritní komponenty. [4] Identita hlavních monoterpenů smrkové pryskyřice je dlouhodobě známa. Minoritní antenálně aktivní látky však nebyly doposud identifikovány. V předkládané diplomové práci jsme se snažili nalézt odpovědi na otázky i) zda sucho ovlivňuje složení pryskyřice a ii) které těkavé látky pryskyřice jsou lýkožrouty vnímány.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Chemická ekologie

Chemická ekologie je vědecká disciplína, která se zabývá zkoumáním chemicky zprostředkovanými interakcemi mezi organismy. Jako samostatná vědecká disciplína byla uznána v šedesátých letech dvacátého století a mezi její významné průkopníky patří Němci D. Schneider a A. Butenandt a Američané T. Eisner, J. Meinwald a R. Silverstein. [5]

Hmyz, jako jedinec nebo celá populace, používá specifické dorozumívací prostředky. Jedná se o signály fyzikální povahy - zvukové, zrakové, hmatové, elektromagnetické a především chemické. Pro chemickou komunikaci využívá hmyz čichové a chuťové smysly. Čichová komunikace je zprostředkována chemickými látkami rozptýlenými ve vzduchu, chuťová komunikace využívá látky rozpuštěné ve vodě. Těkávé chemické látky využívané k dorozumívání živočichů se souborně nazývají semiochemikálie a jsou vnímány čichovými receptory umístěnými na tykadlech. Tyto látky je možné rozdělit na dvě základní kategorie - na látky sloužící k vnitrodruhové komunikaci - feromony - a na látky sloužící k mezidruhové komunikaci - tzv. allomony neboli allelochemikálie. Allelochemikálie lze dále dělit dle prospěšnosti pro organismus vysílající signál nebo pro příjemce signálu na allomony, kairomony a synomony. Allomony jsou látky, sloužící k mezidruhové komunikaci, kdy má z komunikace prospěch vysílající organismus. Tyto chemikálie obvykle slouží k ochraně proti predátorům. Kairomony jsou naopak látky, sloužící k mezidruhové komunikaci, kdy má prospěch z komunikace organismus přijímající chemický signál. Synomony jsou látky prospěšné jak pro vysílací, tak pro přijímací organismus. [6]

Chemická komunikace mezi rostlinami a herbivorními druhy hmyzu je intenzivně studována. [7] Herbivorní hmyz pomocí látek obsažených v rostlinách nebo rostlinou vydávaných hledá vhodné živné rostliny (kairomony), nebo se rostlina naopak určitými látkami brání napadení hmyzem nebo dalšími herbivory (potravní deterenty). Rostlina může také pomocí chemických látek lákat opylovače apod. Látkám, které tyto chemické vztahy zprostředkovávají, se říká sekundární rostlinné metabolity (SRM). SRM jsou definované jako sloučeniny, které nemají žádnou zřejmou funkci v metabolismu rostliny a které se vyvinuly jako obranné látky proti herbivorům, parazitům nebo kompetitorům.

Druhotně se stávají chemickými vodítky (atraktanty a fagostimulanty) pro ty konzumenty, kteří si proti jejich působení vyvinuli vlastní obranné mechanismy. SRM se uplatňují v mnoha komplexních ekologických interakcích. Rostlinné emanace uvolňované při napadení herbivorním hmyzem např. lákají z dálky jejich nepřátele. Rostliny mohou pomocí SRM i vzájemně komunikovat např. při napadení stimulují okolní jedince k preventivnímu zvýšení produkce obranných látek.

Při výběru hostitelské rostliny fytofágové používají jak čichových, tak chuťových vodítek. Výběr je založen na interakci mnoha faktorů, především na atraktivitě zprostředkované čichem a podmíněné specifickými těkavými SRM a na charakteru chuťových signálů, které buď stimulují k žíru, nebo odpuzují (obránné SRM). Hmyz je ovlivňován SRM buď okamžitě, kdy mají vliv na chování, anebo s prodlevou po pozření, kdy mají účinky fyziologické, způsobují intoxikaci apod. Látky působící bezprostředně na chování lze rozdělit na repelenty, vyvolávající orientovaný pohyb od zdroje, atraktanty podněcující orientovaný pohyb ke zdroji, arestanty způsobující agregaci u zdroje, stimulanty, které podněcují žír, páření, kladení a supresanty, které žír, páření a kladení inhibují. Rostlinné atraktanty jsou těkavé látky, nejčastěji působící ve směsích. Většinou jsou to SRM, které byly určitými druhy herbivorního hmyzu druhotně využity jako vodítka pro vyhledání potravy či místa k ovipozici. Nejčastěji to bývají monoterpeny a seskviterpeny, alkoholy, estery, kyseliny, fenyylpropanoidy a některé sirné sloučeniny. Směsi těkavých alkoholů a aldehydů ( $C_6-C_{10}$ ), které emitují z listů v různých poměrech prakticky všechny zelené rostliny, působí atraktivně na mnoho druhů a obecně se jim říká „green-leaf-volatiles“. [8]

## 2.2 Smrk ztepilý

Strom dorůstající do výšky 50 m s plochým kořenovým systémem a zkráceným hlavním kořenem. Kmen je vzpřímený, rovný, se štíhlou, pravidelně rozvětvenou jehlancovitou korunou. Kůra kmene je v mládí hladká, světle hnědá, později červenohnědá až šedá. Borka se odlupuje v tenkých šupinkách. Pupeny jsou kuželovité a neobsahují pryskyřici. Jehlice jsou tmavozelené, lesklé, téměř čtyřhranné, špičaté. Hnědé šišky jsou válcovitě podlouhlé. Smrk ztepilý roste na chladnějších stanovištích s větší vlhkostí. Je charakteristickým druhem jehličnatých lesů mírného pásma. [9]

### 2.2.1 Taxonomické zařazení

Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karsten)

říše: *Plantae* (rostliny)

oddělení: *Pinophyta* (pinofyty)

třída: *Pinopsida* (jehličnany)

řád: *Pinales* (borovicotvaré)

čeleď: *Pinaceae* (borovicovité) [10]

### 2.2.2 Výskyt

Smrk ztepilý je hojně vyskytující se jehličnan v severní a střední Evropě viz obr. 2.1, ale můžeme ho nalézt i v USA a Kanadě. Je pěstován především jako významný zdroj dřeva, ale nachází se i ve městech jako okrasná dřevina, může sloužit jako větrolam a sněholam. [11]



Obr. 2.1 Mapa výskytu smrku ztepilého v Evropě [12]

## **2.3 Obrana smrku proti patogenům a predátorům**

Jehličnaté stromy mají účinný obranný systém, starý nejméně 45 miliónů let, který odpuzuje nebo zabíjí herbivory a brání fyziologicky a chemicky průniku patogenů. Obranný systém se skládá z konstitutivních a indukovaných obranných mechanismů. [13]

### **2.3.1 Konstitutivní obrana**

Konstitutivní obrana je přítomna ve tkáních před kolonizací stromu herbivory a patogeny. Konstitutivní systém je první obrannou linií všech organismů, včetně rostlin, skládá se z celé řady fyzikálních a chemických překážek. U jehličnanů je hlavní složkou konstitutivní obrany pryskyřice, komplexní směs monoterpenů, seskviterpenů a diterpenických kyselin. Pryskyřice je skladována v pryskyřičných kanálcích, puchýřcích a buňkách. [14] Tyto struktury pryskyřici hromadí pod tlakem. Při poškození stromu nebo při napadení cizím organismem dojde k uvolnění toxické pryskyřice, která může napadající organismus zabít, nebo může „zalepit“ napadající organismus a rovněž má repelentní účinky. [15]

### **2.3.2 Indukovaná obrana**

Rostliny mají vyvinutý mechanismus indukované obrany z toho důvodu, že biosyntéza pryskyřice je energeticky náročným procesem. Na rozdíl od konstitutivní obrany tento druh obrany vyžaduje energii pouze tehdy, když je rostlina napadena či poškozena. Indukovaná obrana je u jehličnanů rozmanitá a zahrnuje strukturní změny a syntézu chemických látek - terpenů, fenolických látek a hydrolytických enzymů. [14] Indukovaná obrana je namířena proti patogenům a zahrnuje buněčné a biochemické změny. Během útoku herbivora či patogenu část pryskyřice vytéká z již existujících struktur produkující pryskyřici a pro vyšší produkci mohou být aktivované i konstitutivní kanálky. [16]

## **2.4 Stres a druhy stresu**

Fyziologie rostlin je ovlivňována mnoha faktory, přičemž mezi nejdůležitější patří světlo, teplota, voda a živiny. Rostliny jsou schopné žít v relativně velkém rozmezí těchto faktorů. Pokud změny těchto faktorů životního prostředí přesáhnou limity

tolerance, dochází k vážným poruchám rostlinné fyziologie, k poškození rostlinných orgánů a posléze k smrti. Stav rozvíjející se v rostlinném organismu po překročení limitu tolerance, se nazývá stres. Rozvoj stresové reakce je doprovázen specifickými projevy, které zahrnují nejprve produkci stresových signálních molekul a poté rozvoj stresových syndromů a obranných reakcí, vedoucích k obnově homeostázy. Při velké stresové zátěži se rozvíjí akutní stresová reakce provázená poruchami buněčných fyziologických pochodů a poškozením rostlinných orgánů. [17]

Rostlina začíná na stres odpovídat v okamžiku, kdy dojde k narušení existující homeostázy. V takovém případě dojde k aktivaci specifických kompenzačních mechanismů, které vedou k obnovení homeostázy. Pokud je i tato homeostáza nadále narušována, tak rostlina není schopna nastalé změny fyziologie kompenzovat a může dojít až k její smrti. V případě, že obnovená homeostáza není dále narušována se rostlina začne regenerovat. Míra a schopnost regenerace závisí na míře vyčerpání. Lze tedy rozlišit 4 fáze stresové odpovědi: 1) reakční – reakce na začátek stresu, tvorba stresových signálních molekul 2) restituční – znovuoobnovení homeostázy, nastartování kompenzačních mechanismů, které vedou k obnově homeostázy ve změněných podmínkách, 3) vyčerpání – mobilizované mechanismy nedokáží kompenzovat nepříznivé podmínky, dochází nejprve k parciálním poškozením jednotlivých orgánů, později k celkovému rozvratu metabolismu (při dlouhodobém stresu se jedná o konečnou fázi), 4) regenerace. [18]

#### **2.4.1 Vodní stres**

Voda je základní složkou pro život rostlin. Ve vodě se uskutečňuje příjem, transport a metabolismus látek. Voda je rostlinou přijímána z půdy kořeny a vylučována odpařováním z listů. Vodní rovnováha rostlin je dána vztahem mezi objemem přijaté a vydané vody. Pokud je výdej vody větší než příjem, pak vzniká vodní deficit, při kterém dochází k poruše fyziologických funkcí, jako je zastavení růstu a fotosyntézy.

Nedostatek vody u smrků snižuje jejich schopnost obrany proti patogenním činitelům a fytofágům. Snížení obranyschopnosti je způsobeno snížením tlaku v buňkách kolem pryskyřičných kanálků resp. tlaku pryskyřice a dalšími faktory. Suchem oslabený strom má menší naději, že fyzicky zabrání průniku patogenů. [19]



## **2.4.2 Vliv vodního stresu na produkci těkavých rostlinných látek**

Působením abiotického nebo biotického stresu, jako je např. vysoká teplota nebo napadení rostliny herbivorem, dochází u rostlin ke změnám emisí BVOC.

Rostliny uvolňují do atmosféry kromě jednoduchých plynů, jako např. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> a vodní páry, široké spektrum BVOC - terpeny, deriváty mastných kyselin, benzenoidy, fenypropanoidy a metabolity aminokyselin. Uvolňování BVOC z rostlin se liší v závislosti na druhu, vývojové fázi, environmentálních podmínkách a intenzitě stresu. [20] K uvolňování většího množství BVOC dochází při poškození vegetativních částí rostliny herbivorem. [21]. Stresové faktory mohou měnit poměr koncentrací různých rostlinných metabolitů včetně BVOC. [20] Vliv stresu na produkci BVOC závisí na jeho intenzitě. Zatímco mírný stres může vést k přechodnému zvýšení produkce BVOC, intenzivní stres vede k vyčerpání zásob uhlíku, a v důsledku pak ke snížení množství emitovaných BVOC. Vliv vodního stresu na produkci těkavých látek byl intenzivně studován především ve vztahu ke globálnímu oteplování, protože množství BVOC a jejich složení se významně podílí na klimatických podmínkách. [22] Výsledky prací zabývajících se studiem sucha na produkci BVOC však nejsou jednoznačné. V některých pracích se uvádí, že sucho vedlo ke zvýšení produkce BVOC, zatímco v jiných bylo sucho provázeno snížením. Indukce emisí BVOC různými stresovými faktory je součástí reakce rostlin na zmírnění negativních důsledků stresu. [23]

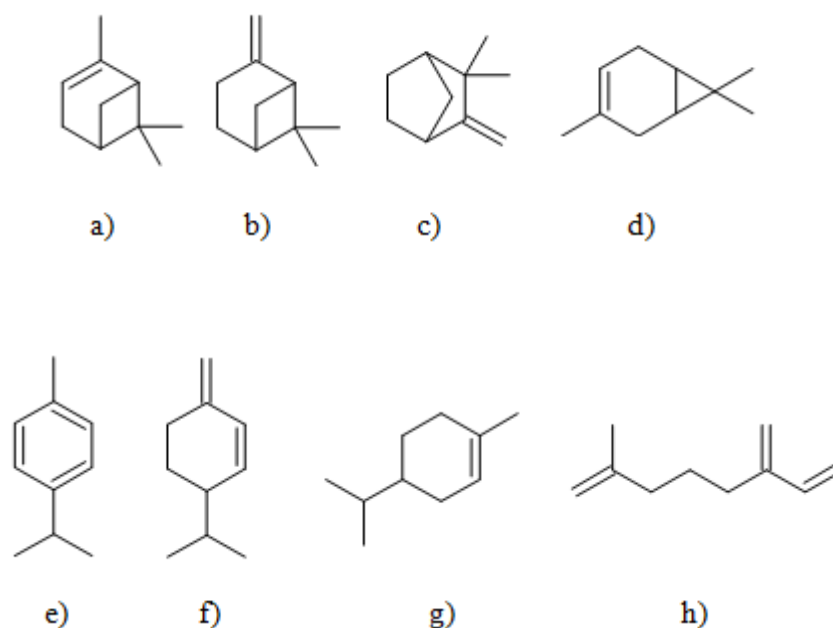
Izopren, monoterpeny a seskviterpeny mají schopnost zmírňovat abiotický stres. Díky vysoké reaktivitě monoterpenů a seskviterpenů s kyslíkovými radikály, které se tvoří ve stresovaných tkáních, dochází ke zmírňování oxidačního stresu. [24]

Biogenní těkavé látky slouží jako přímá obrana proti herbivorům, kdy mohou působit tyto látky jako přímé repelenty. [25] Rovněž přitahují predátory herbivorů. [26] Rostliny mezi sebou mohou pomocí BVOC komunikovat. Produkci BVOC je indikována přítomnost herbivora a rostliny mohou stimulovat rozmístění obrany v oblasti, kde se herbivor vyskytl. [27]

### **2.4.2.1 Izoprenoidy**

Izoprenoidy jsou významnou součástí BVOC a smrkové pryskyřice. Tvoří velkou skupinu rozmanitých organických látek. Struktura izoprenoidů je složena z charakteristických izoprenových jednotek složených z pěti uhlíků (C<sub>5</sub>) viz obr. 2.2. [28]

Izoprenoidy lze rozdělit podle počtu izoprenových jednotek v molekule na hemiterpeny ( $C_5$ ), monoterpeny ( $C_{10}$ ), seskviterpeny ( $C_{15}$ ) a diterpeny ( $C_{20}$ ) atd. Izoprenoidy jsou lipofilní nízkomolekulární látky. Pouze izopren, monoterpeny, seskviterpeny a některé diterpeny jsou těkavé již při běžných teplotách. [27] U jehličnatých stromů jsou terpeny součástí pryskyřice skladované v pryskyřičných buňkách a kanálcích. Pryskyřice je součástí primární (konstitutivní) a indukované (sekundární) obrany jehličnanů proti hmyzím herbivorům a patogenům [29]

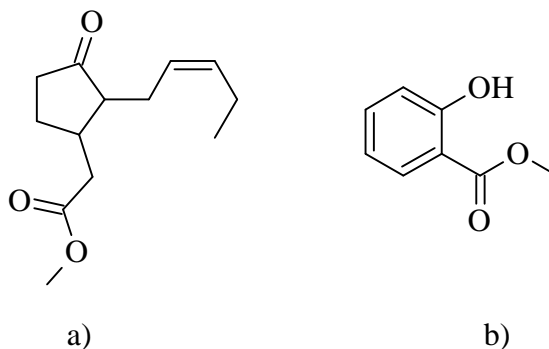


Obr. 2.2 Strukturní vzorce vybraných antenálně aktivních látek pro *I. typographus*:

- a)  $\alpha$ -pinen b)  $\beta$ -pinen c) kamfen d)  $\Delta^3$ -karen e) *p*-cymen f)  $\beta$ -felandren g) limonen  
h)  $\alpha$ -myrcen

#### 2.4.2.2 Neterpenické složky BVOC

Do skupiny BVOC patří i těkavé hormony rostlin methyljasmonát, methylsalicylát a ethylen viz obr. 2.3. Tyto látky stimulují v rostlině expresi „obraných“ genů jako odpověď na napadení herbivorem či patogenem. [30] Jsou produkovány stresovanými rostlinami a podílí se na rozvoji stresových odpovědí. Současně jsou uvolňovány do vzduchu, kde představují významný komunikační signál [31]



Obr. 2.3 Vzorce neterpenických složek BVOC: a) methyljasmonát, b) methylsalicylát

## 2.5 Lýkožrout smrkový

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) patří ve střední Evropě mezi nejvýznamnější škůdce dospělých smrkových porostů. Vyvíjí se téměř výhradně na smrku ztepilém (*Picea abies*), výjimečně na modřínu opadavém (*Larix decidua*). Napadá především čerstvě vytěžené smrkové dříví, padlé smrky v polomech nebo z nejrůznějších příčin fyziologicky oslabené stojící stromy. Při nedostatku vhodných stromů pro zakládání potomstva, začíná napadat i zdravé stojící smrky. Škodlivost lýkožrouta souvisí se zdravotním stavem porostů a vhodnými klimatickými podmínkami v daném místě. [32]

### 2.5.1 Taxonomické zařazení

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* (Linnaeus, 1758))

říše: *Animalia* (živočichové)

kmen: *Arthropoda* (členovci)

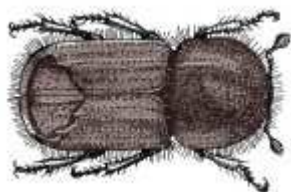
třída: *Insecta* (hmyz)

řád: *Coleoptera* (brouci)

čeleď: *Curculionidae* (nosatcovití) [33]

### 2.5.2 Vzhled

*I. typographus* dosahuje velikosti 4,2-5,5 mm. Má lesklé černohnědé tělo se světle žlutými chloupky. Tykadla má žlutavá, paličkovitá s lomeným švem. Štít má v přední části hrbolkovitý, vzadu jemně tečkovaný. [34]



Obr. 2.4. Lýkožrout smrkový (*I. typographus*) [35]

### 2.5.3 Rozšíření

Lýkožrout smrkový patří mezi nejškodlivější kůrovce v našich krajinách. Vyskytuje se v oblastech, kde se vyskytuje smrk ztepilý, od nížin až po vysokohorské polohy. Lýkožrout smrkový potřebuje pro vývin larev silnou vrstvu lýka, z toho důvodu se vyskytuje spíše na vzrostlých stromech, je tak typickým škůdcem porostů starších věkových tříd tj. od 60 let výše. V mladších porostech se vyskytuje až při silném přemnožení. Při přemnožení kůrovce bylo nalezeno na 1 m<sup>2</sup> kůry až 350 závrťů, přičemž ve stromě bylo nalezeno až 900 brouků. [34]

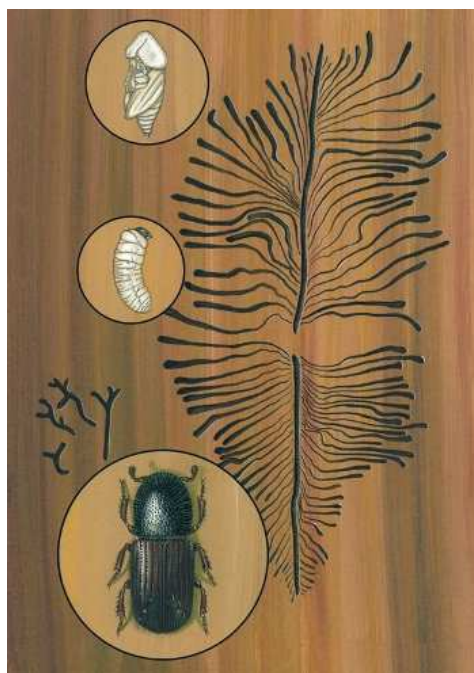
V České republice převládají smrkové monokultury např. na Šumavě, takže druhy hmyzu vázané na smrk (*Picea abies*) zde mají velmi vhodné podmínky k vývoji. Na Šumavě bylo nalezeno 26 druhů kůrovců, přičemž mezi nejčastěji zastoupené druhy patří právě *I. typographus*. [36]

### 2.5.4 Životní cyklus

Na jaře nastává rojení lýkožroutů opuštěním zimních úkrytů. Nejprve vylétají pohlavně nevyzrálí jedinci a o jeden až dva týdny později začínají vylétávat jedinci pohlavně vyzrálí. Nepohlavně vyzrálí jedinci nalétávají na okraje odchlíplé čerstvé kůry na pařezech, na oříznuté čerstvé vrcholky stromů, na zemi ležící čerstvě odseknuté větve, kde hlodají svůj výživný žír a pohlavně dospívají. Po 7-14 dnech začínají nalétávat na

kmeny, kde se začínají rozmnožovat. Dospělí jedinci, kteří ze zimních úkrytů vylétají již pohlavně vyzrálí, zakládají své snubní komůrky již při prvním letu.

Za normálních podmínek je pro vývoj lýkožrouta smrkového nejlepší prostředí pod kůrou vývrátů smrkových kmenů, které jsou obvyklým důsledkem vichřic a sněhových polomů. Teprve při silném přemnožení, kdy v přírodě nenalézají dostatek vhodného prostředí, napadá i stromy zdravé. Pod kůru se nejprve zavrtává sameček, který vyhledává odstávající šupiny a místa kolem suků. Místo závrťů na padlém kmeni prozradí hnědá drť, na zdravém kmeni nejprve výron několika kapek pryskyřice a později rovněž drť. Po několika dnech za samečkem přilétají samičky a pomocí čichu vyhledávají místa závrťů. Po spáření v tzv. snubní komůrce začínají samičky hlodat v kůře matečné chodby a klást vajíčka. Samička během svého života naklade 20-100 vajíček, která jsou bílá, oválná, lesklá a v průměru dosahují 0,6-1 mm. Po 7-14 dnech se vylíhnou beznohé, bílé larvy. Larvy se zařizují do lýka a hlodají směrem kolmo od matečné chodby (obr. 2.5).



Obr. 2.5 Požerek lýkožrouta smrkového (*I. typographus*) [37]

Po několika týdnech se larva mění v bílou kuklu, ze které se po přibližně 14 dnech vyvine bílý brouk, který postupně žloutne a později zhnědne. Vylíhnutí brouci hlodají

nepravidelnou, parohovitě se vinoucí chodbu, přičemž pohlavně dospívají. Celkový vývoj lýkožrouta smrkového od zavrtání samečka až po výlet nových dospělých jedinců trvá 6-10 týdnů. Přezimování lýkožrouta smrkového obvykle probíhá pod kůrou na místě vývinu, a to nejčastěji ve stadiu vylíhlých brouků. [34]

### 2.5.5 Přirození nepřátelé

Lýkožrout smrkový má řadu přirozených nepřátel. Některé dravé druhy hmyzu jej loví příležitostně, jiné druhy hmyzu se na lýkožrouta smrkového (případně další kůrovce) potravně specializují. K nejznámějším predátorům z řádu brouků patří dospělci i larvy pestrokrovečníka mravenčího (*Thanasimus formicarius*, L.) a drabčíka *Nudobius lentus*, Graven.. Z dvoukřídlého hmyzu napadají larvy lýkožrouta smrkového druhy *Medetera signaticornis* Lw. nebo *Lonchaea seitneri* Hendel (1928), z blanokřídlého hmyzu jsou to především lumčíci (*Braconidae*) - například *Coeloides bostrichorum* Gir. a chalcidky (*Chalcidoidea*) - *Rhopalicus tutela* Walk. Na lýkožroutovi cizopasí také množství roztočů (*Uropoda polytricha* Vitzth.) a hlístic (*Parasitophelenchus typographi* Fuchs). Nezanedbatelný podíl na mortalitě lýkožrouta smrkového mají také některé entomopatogenní houby z rodu *Beauveria*. [32] Kůrovci slouží jako potrava pro ptáky, kteří je lapají při rojení, nebo je vyklovávají z kůry ve stadiu larev. Mezi významného predátora lýkožrouta smrkového patří datel černý. [34]

### 2.5.6 Metody obrany lesa proti kůrovcům

Při přemnožení lýkožrouta smrkového se jeho výskyt monitoruje a jsou zavedena účinná obranná opatření založená na třech základních principech, zahrnujících preventivní opatření i kurativní zásahy. Mezi základní principy patří včasné (tzn. před začátkem rojení) zpracování veškerého dříví vhodného pro vývoj a namnožení lýkožrouta smrkového (např. větrné polomy apod.). Dále odstranění (nebo asanace) veškerého materiálu napadeného lýkožroutem smrkovým, před dokončením vývoje, nejlépe ve stadiu larev a soustředění a hubení lýkožrouta smrkového v ohniscích žíru (např. feromonovými lapači, lapáky, otrávenými lapáky).

Lapače jsou pasti sloužící k zachycení lýkožrouta smrkového, kdy se k lákání používají feromonové návnady. Feromonová návnada je odparník obsahující určité množství agregačního feromonu příslušného druhu kůrovce zajišťující jeho samovolné

uvolňování do ovzduší v množství vhodném pro lákání škůdce. Lapače jsou evidovány a pravidelně se kontrolují v daném intervalu.

Lapáky využívané k hubení lýkožrouta smrkového jsou evidované, skácené, zdravé, zpravidla odvětvené smrky nebo jeho části, atraktivní pro lýkožrouta smrkového, připravené pro jeho kontrolu a hubení. Jako lapák je možné využít i vývrat nebo zlom uvedených parametrů. Lapáky se zakrývají po celé délce větvemi (jako ochrana proti předčasnému vysychání). Otráveným lapákem rozumíme skácený a odvětvený smrk nebo jeho část, ošetřený po celém povrchu vhodným insekticidem těsně před předpokládaným začátkem rojení lýkožrouta a opatřený feromonovou návnadou. Otrávené lapáky jsou používány zejména na nepřístupných lokalitách, kde by nebylo možné pravidelně kontrolovat lapáky či lapače. [38]



Obr. 2.6 Feromonový lapač [39]

## 2.6 Metody analýzy přírodních látek

Analýza přírodních látek je náročná, neboť semiochemikálie jsou produkovány ve velmi malých množstvích, v některých případech řádově pouze v pikogramech. Semiochemikálie jsou analyzovány pomocí analytických metod a pomocí speciálních metod je zjišťována jejich biologická aktivita.

### 2.6.1 Metody izolace vzorků semiochemikálií

#### *Destilace s vodní parou*

Destilace s vodní parou se používá k získávání přírodních látek z rostlin. Při destilaci s vodní parou prochází pára z vroucí vody vzorkem po dobu 60 minut až několik hodin, kdy dochází k uvolnění většiny těkavých látek. [44] Tento způsob umožňoval získání většího množství látek, které mohly být chemicky charakterizované. V současné době se metoda používá výjimečně kvůli potřebě velkého množství vzorku a zároveň při destilaci vodní parou dochází k degradaci citlivějších látek. [9]

#### *Extrakce*

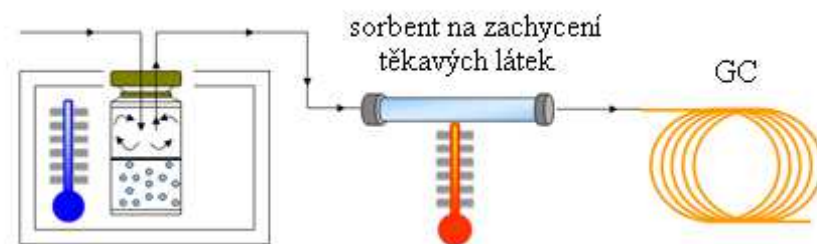
Nejjednodušší metodou izolace přírodních látek je extrakce rozpouštědlem. Výsledek extrakce je ovlivněn volbou rozpouštědla a teploty. Pro získání velmi koncentrovaného vzorku je nutné zvolit co nejmenší objem rozpouštědla. Zároveň by zvolené rozpouštědlo mělo extrahovat maximální množství aktivních látek a co nejméně látek balastních, tento požadavek je obtížně splnitelný, a tak dochází k výskytu velkého množství balastních látek v extraktu. [9]

#### *Headspace techniky*

Pro těkavé přírodní látky, které mají dostatečnou tenzi par při laboratorní teplotě, aby mohly být přenášeny proudem vzduchu, je vhodné použít tzv. headspace techniky. Headspace techniky mohou být v tzv. statickém uspořádání, kdy dochází k odběru vzorku z atmosféry nad přírodním materiálem pomocí plynotěsné stříkačky a vzorek je dávkován přímo do plynového chromatografu. Další možností je použít tzv. dynamické uspořádání, kdy dochází ke kontinuálnímu strhávání těkavých látek proudem vzduchu. Dynamické uspořádání vede ke koncentrovanějším vzorkům, protože jímané látky jsou postupně koncentrovány na adsorbent, ze kterého se poté získají vymytím



rozpouštědlem, nebo se tepelně desorbují přímo v dávkovači plynového chromatografu. [41]



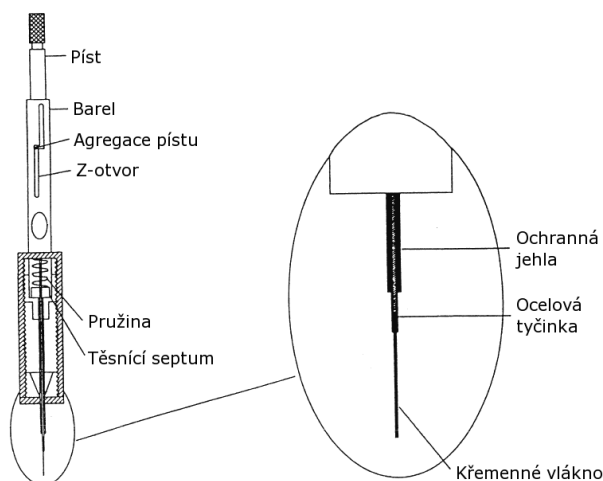
Obr. 2.7 Schéma headspace techniky [42]

Nejčastěji používané materiály sorbentu jsou Porapak Q (kopolymer ethylvinylbenzen-divinylbenzen), Tenax (polymer 2,6-difenyl-p-fenyleneoxid) a aktivní uhlí. Headspace techniky umožňují izolaci látek ve vyšších koncentracích než metoda extrakce. [9]

#### ***Mikroextrakce na pevné fázi (SPME)***

Metoda mikroextrakce na pevné fázi je použitelná pro adsorpci těkavých látek, kdy dochází k jejich zakoncentrování.

Metoda využívá speciální injekční stříkačku s kovovou jehlou, v jejímž vnitřním prostoru je křemenné vlákno, které je z vnější strany potažené stacionární fází. Schéma je znázorněno na obr. 2.8. Při izolaci těkavých přírodních látek se vlákno vysune z jehly a látky se nechají po určitou dobu adsorbovat. Poté se vlákno zasune do injektoru (dávkovače) plynového chromatografu a látky se desorbují. Metoda SPME má řadu výhod, jako je jednoduchost metody, nízké náklady a kompatibilita s analytickými systémy. Nevýhodou je použití vzorku pouze k jediné analýze, protože všechny adsorbované látky se desorbují současně. [43]



Obr. 2.8 Schéma techniky SPME [43]

## 2.6.2 Metody analýzy vzorků

Vzorky přírodních látek jsou směsí látek, proto je nutné použít separační analytické metody. U větších množství izolovaných látek je možné použít klasické spektrální metody [9], ale obsah látek ve vzorku semiochemikálií se pohybuje v nízkých koncentracích (ng, pg), proto je nutné použít citlivější analytické metody.

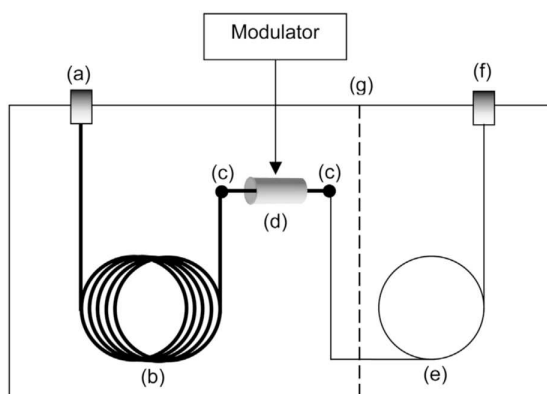
### *Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC - MS)*

Pro analýzu těkavých látek je nejčastěji využívána metoda plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí spojující výhodu separace složitých směsí analytů a jejich následné hmotově spektrometrické analýzy.

### *Dvourozměrná plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (GC×GC-MS)*

Vícerozměrná plynová chromatografie se využívá ke zvýšení účinnosti separace, čímž je umožněna analýza složitých směsí a zároveň je její výhodou spotřeba malého množství vzorku. Dvourozměrné systémy vyžadují dva nezávislé oddělené separační mechanismy při zachování spojení primární kolony s kolonou sekundární. [44] Analyt při tomto zapojení prochází primární kolonou a poté krátkou sekundární kolonou (obr. 2.9). Při GC×GC se používají dvě stacionární fáze s rozdílným způsobem separace (např. nepolární × polární) během jediné analýzy a tímto způsobem je zajištěno ortogonální dvojrozměrné chromatografické uspořádání. [45] Separační fáze jsou

spojené prostřednictvím integrované kryogenní pasti. V kryogenní pasti dochází opakovaně ke kondenzaci složek, které jsou eluovány z primární kolony. Do sekundární kolony jsou pravidelně uvolňovány pomocí krátkých pulzů. Parametry jako jsou např. trvání a četnost pulzů jsou variabilní a umožňují přesné ladění přístroje podle požadavků analýzy. GC×GC v závislosti na frekvenci kryogenní modulace produkuje velmi úzké píky (až 50 ms), proto je nutné použít rychlý detektor. Vhodný je průletový hmotnostní detektor (TOFMS), který je schopen detekovat rychlostí až 500 spekter za sekundu. GC×GC s detekcí TOFMS pracuje s vysokou přesností nezávislou na koncentračním rozmezí. [46]



Obr. 2.9 Schéma GC×GC: a) injektor, b) kolonové konektory, c) kryomodulátor  
d) sekundární kolona, e) detektor [47]

TOFMS pracuje na principu měření času, který potřebuje ion k překonání vzdálenosti mezi iontovým zdrojem a vlastním detektorem, tzv. doby letu  $t$ . Doba letu je funkcí měrné hmotnosti iontu,  $m/z$ , kterou lze vypočítat ze vztahu:

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}$$

kde  $m$  je hmotnost,  $z$  je náboj,  $L$  je délka driftové zóny,  $e$  je elementární náboj a  $U$  je urychlovač napětí. Výhodou TOF analyzátoru je jeho vysoká citlivost, velmi krátká doba analýzy a teoreticky neomezeně vysoká maximální  $m/z$ .

### ***Plynová chromatografie s detekcí pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (GC-FTIR)***

Využitím metody plynové chromatografie s detekcí pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací získáme informaci o struktuře přírodních látek. FTIR spektrofotometr zaznamenává infračervené spektrum vzorku. Metoda GC-FTIR je vhodná k určení izomerů organických sloučenin. [48]

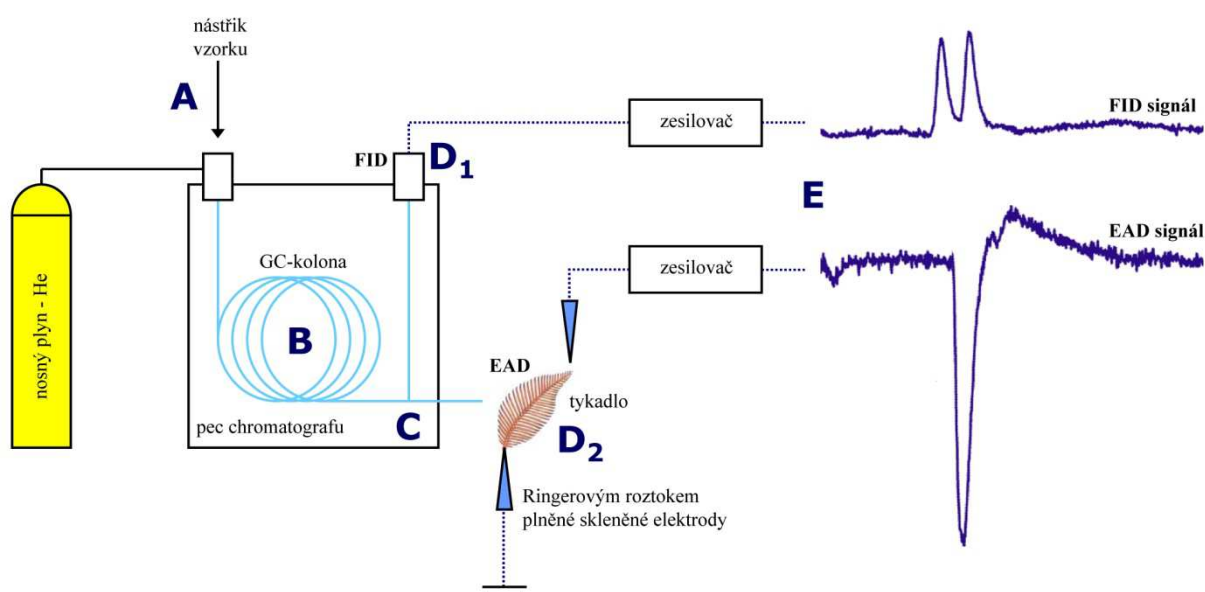
### ***Nukleární magnetická rezonance (NMR)***

K identifikaci chemické struktury je využívána metoda NMR. Její nevýhodou je, že pro získání vysoce kvalitního spektra sloužícího k určení struktury metoda vyžaduje poměrně velké množství čisté látky (až 100 µg), což při analýze semiochemikálií většinou není možné. Požadavek na velké množství čistého materiálu je kvůli relativně nízké citlivosti metody. Metoda NMR vyžaduje značnou čistotu vzorků, které musí být očištěné od ostatních složek směsí. [49]

### ***Elektroantenografie***

Elektroantenografie (EAG) je neurofyzilogická metoda, která byla vyvinuta přibližně před 55 lety Schneiderem. [50] Tato metoda umožňuje identifikaci specifických těkavých látek, které vyvolávají fyziologické odpovědi u hmyzu. [51] Metoda se používá ve spojení s plynovým chromatografem (GC-EAD), kdy tykadlo hmyzu slouží jako biologický detektor. Tykadlo je umístěné mezi dvě elektrody, které jsou tvořeny skleněnými kapilárami s mikrohrotem naplněnými Ringerovým roztokem. V roztoku každé elektrody jsou umístěné stříbrné drátky spojené se zesilovačem. Napětí, které vzniká mezi referenční elektrodou umístěnou na bázi tykadla a snímací elektrodou umístěnou ve smyslovém epitelu tykadla, je zesilováno zesilovačem a signál je dále veden do PC, kde je zaznamenáván a analyzován specifickým softwarem. Paralelně k biologickému detektoru, který zaznamenává jen antenálně aktivní látky, se používá plamenově-ionizační detektor (FID), který není selektivní a zaznamenává všechny látky. Při GC-EAD-FID analýze je eluát rozdělen pomocí kovového splitteru na dvě poloviny. Jedna polovina je vedena do FID a druhá je vedena do proudu vzduchu směřujícího na tykadlo. Obě ramena by měla být vyrobena z deaktivované křemenné kolony o stejné délce a průměru, tím je zajištěno stejné retenční chování a látky procházejí FID a EAD detektorem současně. Do splitteru je přiváděn pomocný plyn

(dusík, tzv. „make-up“), který kompenzuje pokles průtoku v rozdělených ramenech kolony a brání kondenzaci eluátu ve splitteru. Rozdělení snižuje citlivost pro každý detektor o jednu polovinu, ale umožňuje simultánní srovnání odezvy detektorů. Tykadlo má v klidu klidovou aktivitu a při jeho podráždění vzniká negativní elektrický potenciál, který trvá po celou dobu podráždění. Jestliže signál FID odpovídá signálu EAD, tak se jedná o antenálně aktivní látku (semiochemikálii). Pro potvrzení antenálně aktivní látky je vhodné zanalyzovat a porovnat ještě standard příslušné látky. [52]



Obr. 2.10 Schéma GC-EAD: **A** nástřík analyzované směsi, **B** separace sloučenin na kapilární koloně, **C** rozdělení proudu nosného plynu s analyty z kolony, kdy jedna polovina putuje k ionizačnímu detektoru (FID) a druhá polovina směřuje na tykadlo hmyzu, **D1** FID dává signál úměrný množství těkavých látek vycházejících z kolony, **D2** rameno směřující na tykadlo je vyvedeno mimo pec GC a končí ve směsné komůrce, kam je přiváděn vzduch. Obohacený vzduch o eluované látky směřuje na tykadlo. Při eluci aktivní látky tykadlo změní elektrický potenciál (mV). Signál je veden do PC. Tam jsou signály FID a EAD společně vyhodnoceny a následně zobrazeny. **E** zesílení elektrických impulsů v čase. [53]

### **2.6.3 Vícerozměrná analýza (analýza hlavních komponent – PCA)**

V ekologii je obvyklé, že zkoumaný jev velmi často ovlivňují různé proměnné, které mají navíc vlastní vzájemné vazby. Pro analýzu tak složitého jevu jako je vliv sucha na složení komplexní směsi pryskyřice smrků je nutné použít speciální metody vícerozměrné analýzy, které kladou důraz na souhrnnou analýzu sady proměnných namísto zaměření na jednotlivé proměnné. Jednorozměrné metody zůstávají základem statistické analýzy dat, ale vícerozměrné metody představují nadstavbu poskytující komplexní pohled.

Mezi vícerozměrné analýzy dat patří i analýza hlavních komponent, PCA. Při PCA jsou původní proměnné převedeny do nových. Tyto nové proměnné, nazývané hlavní komponenty, jsou lineárními kombinacemi původních proměnných. Dojde k zredukování počtu proměnných a odstranění kolinearit. Nový, menší soubor proměnných, popisuje veškerou proměnlivost dat. Základní charakteristikou každé hlavní komponenty je její míra variability čili rozptyl. Většina informace o variabilitě původních dat je přitom soustředěna do první komponenty a každá další komponenta popisuje většinu ze zbývajících variability. [54]

### **2.6.4 Metody měření vodního hospodaření stromů**

Voda je nasávána kořeny stromů a je vedena systémem vodivých pletiv (tzv. tracheid) vzhůru k jehlicím, kde probíhá fotosyntéza. Vzlínání vody v tracheidách závisí na jejich průměru a je umožněno specifickými vlastnostmi vody a kapilárními silami tracheid. V procesu fotosyntézy je jen malá část vody zabudována do jednoduchých cukrů. Většina je odpařena přes otevřené průduchy při zachytávání  $\text{CO}_2$ . Odpařená voda je jeden z faktorů, který cirkulaci vody ve stromu umožňuje. Zhruba 400 molekul vody se vypaří při zachycení 1 molekuly  $\text{CO}_2$ . [51]

Pokud je vody v půdě nedostatek, snižuje se množství vody dostupné v koruně stromu pro fyziologické pochody a dochází k uzavírání průduchů a k celé řadě fyziologických adaptací jak v kořenovém systému stromu, tak i v jeho asimilačních orgánech. Jejich cílem je získání a zadržení co největšího objemu dostupné vody. Pokud tato kompenzační opatření nestačí, snižuje se fotosyntéza a rozvíjí se oxidační stres. Obecně platí, že při vysychání půdy se snižuje průtok vody kmenem, který případně zcela ustává. Průtok vody kmenem stromů je možné sledovat prostřednictvím dvou

hlavních metod: (I) měřením transpiračního proudu tzv. sap flow a (II) měřením objemových změn kmene. Měření transpiračního proudu podává informaci, kolik vody protéká kmenem stromu (v části nazývané „běl“ neboli „*sap wood*“). Sap flow je udáván v jednotkách  $\text{kg} \cdot \text{h}^{-1}$  na 1 cm obvodu kmene] a podává informaci o množství vody (v kg), která proteče za 1 hodinu pomyslnou kruhovou výsečí kmene o délce oblouku 1 cm. Druhá metoda zaznamenává změny objemu kmene při průtoku vody. Vzlínání vody v tracheidách závisí na jejich průměru. Parametry průměru tracheid jsou proměnlivé v závislosti na míře odparu z jehlic. Za slunečného dne, kdy strom intenzivně fotosyntetizuje, je síla odparu velká, tracheidy zvětšují průměr a bělí protéká velké množství vody. V noci je síla odparu malá, tracheidy snižují svůj průměr, aby „slabší motor“ mohl dopravit vodu až do koruny stromu. Tyto drobné změny průměrů lze zaznamenat pomocí dendrometrů, který měří objemové změny kmene. Řádově se může jednat o rozdíly 0,1 až 1,0 mm za den. Dendrometr zaznamenává, o kolik se sníží nebo zvýší obvod kmene, z těchto hodnot se získá denní minimum a maximum obvodu kmene. V období sucha, kdy je v půdě nedostatek vody, jsou denní objemové změny kmene menší. [52]

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

alkany C <sub>8</sub> -C <sub>22</sub>	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
bromdekan 97 %	Fluka, Švýcarsko
diethylether p.a.	Penta, Chrudim, ČR
dusík, helium	Messer s.r.o., Praha ČR
<i>n</i> -hexan p.a.	Lachner, Neratovice, ČR
pentan p.a.	Lachner, Neratovice, ČR
silikagel (Sigma 60 A)	Merck, Německo
síran hořečnatý	Lachema, Neratovice, ČR
sorbent SuperQ®	Chrompack, Alltech ARS Inc. Gainesville, Florida, USA
terc-methylbutylether p.a.	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
uhličitan amonný	Lachema, Neratovice, ČR

### 3.2 Přístroje a vybavení

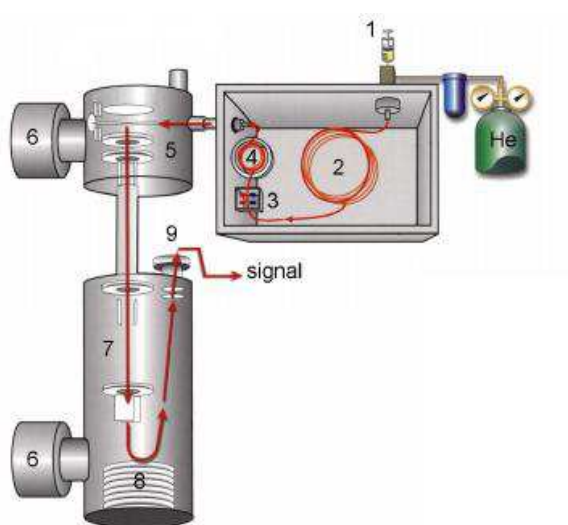
#### 3.2.1 GC-EAD-FID

Standardní 5890A HP GC s FID detektorem a kolonou DB-5 (30 m × 250 μm × 0.25 μm film; J&W Scientific, Folsom, Kalifornie, USA) vybavený následující EAD technikou: „efluent kondicionérem“ – tj. vyhřívaným spojem pro část kolony směřující z GC na biologický detektor, čtyřramenným „splitterem“ Graph-pack 3D/2, EAD zesilovačem s vysokým vstupním odporem ( $10^{13} \Omega$ ) a analogově-digitálním převodníkem. Data získaná z EAD detektoru byla následně zpracována a vyhodnocena pomocí software GC-EAD2000 (vše Syntech, Německo). Pro napojení tykadel k elektrodám byly použity dva mikromanipulátory (Narishige, Japonsko).



### 3.2.2 GC×GC-TOFMS

LECO Pegasus IVD – systém je tvořen plynovým chromatografem Agilent Technologies, 6890N se sekundární pecí a 4-tryskovým kryomodulátorem a TOFMS spektrometrem Pegasus (LECO Corp., St. Joseph, Michigan, USA). Dvourozměrného chromatografického dělení je docíleno využitím kombinace dvou kolon rozdílné polarity: téměř napolární DB-5 (30m × 250 µm × 0.25 µm film; J&W Scientific, Folsom, Kalifornie, USA) v první dimenzi a polární BPX-50 (2 m × 100 µm × 0.1 µm film; SGE Inc., Austin, Texas, USA) v dimenzi druhé.



Obr. 3.1 Schéma LECO Pegasus IVD: 1 nástřik vzorku, 2 primární kolona, 3 kryomodulátor, 4 sekundární kolona, 5 ionizační komora, 6 turbomolekulární vývěva, 7 průletový analyzátor, 8 reflektor iontů, 9 detektor. [57]

### 3.2.3 Další materiál

Stříkačky na dávkování vzorků (Hamilton Co., Reno, Nevada, USA).

2 mL šroubovací vialky úzkohrdlé, septa, víčka - (Labicom s.r.o Olomouc, ČR)

Laboratorní váhy (Mettler-Toledo, Švýcarsko)

Pasteurovy pipety (BioRad Laboratories, Kalifornie, USA)

Presslerův nebozez (Haglöf, Švédsko)

Laboratorní třepačka (Heidolph Unimax 1010, ABsystem Praha, ČR)

Nízkoprůtokové pumpy (SKC Limited, model 210-1002 TX, USA)

### **3.3 Software**

#### **3.3.1 Zpracování a vizualizace dat**

GC×GC-TOFMS - ChromaTOF LECO® (LECO Corp., St. Joseph, Michigan, USA).

GC-EAD-FID - vyhodnocovací systém GC-EAD 2000 (Syntech, Německo).

#### **3.3.2 Statistická analýza a grafická vizualizace výsledků**

Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornie, USA).

CANOCO 4.5 (Biometris Plant Research International, The Netherlands).

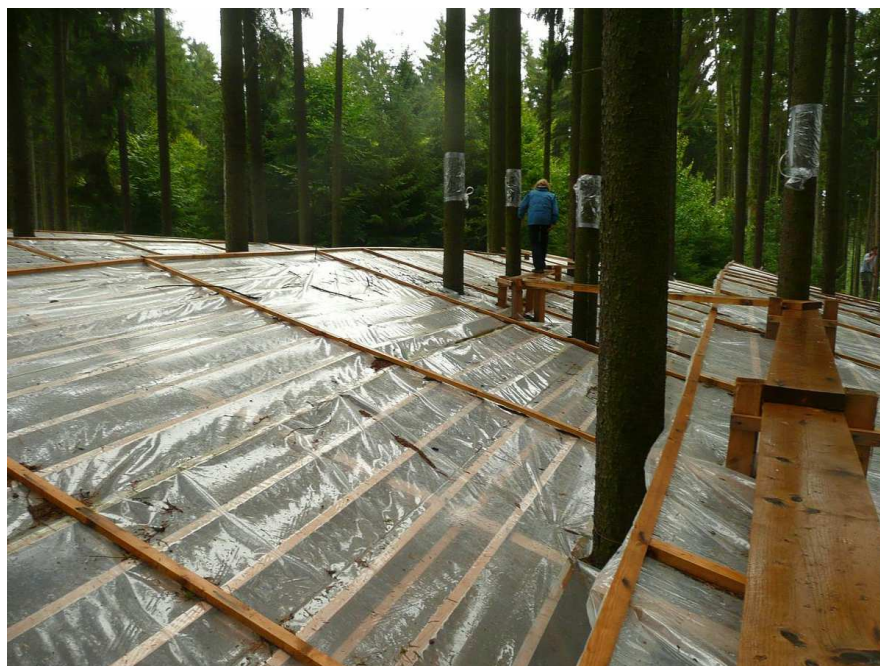
ACD-LabsRelease:12.00 (Product version 12.01)

### **3.4 Terénní pokusy**

Experimenty zaměřené na studium vlivu sucha na složení pryskyřice vzrostlých stromů byly založeny v roce 2010 v Kostelci nad Černými lesy v porostu smrků ve věku 80-100 let. V porostu byly vybrány dvě dvojice ploch o velikosti 25×25 m. V každé dvojici byla jedna plocha zastřešena polyethylenovou folií napnutou na dřevěných konstrukcích. Zastřešení bránilo vsakování srážek do půdy. Vlhkost půdy pod zastřešením byla měřena vlhkostními čidly HS 10 (Decagon Devices Inc., USA) umístěnými 30 cm pod povrchem. Pomocí čidel tzv. Gypsum block GB2 (Delmhorst Instrument, USA) byl měřen půdní vodní potenciál. Vodní fyziologie stromů byla monitorována pomocí automatických dendrometrů DR 26 (EMS Brno, Česká republika). Pomocí umístěných čidel EMS 51 (EMS Brno, Česká republika) byl měřen transpirační proud. Zároveň byly na plochách měřeny meteorologické parametry (teplota, srážky, vítr).

Výsledky měření transpiračního proudu a objemových změn kmenů prokázaly, že zastřešení experimentálních ploch provedené v roce 2010 nezpůsobilo významné změny v půdní vlhkosti, a tudíž ani změny ve fyziologii stromů. Z toho důvodu bylo v roce 2011 omezeno pronikání půdní vody z okolí vertikálně umístěnou polyethylenovou folií

dosahující do hloubky 50 cm. Toto opatření vedlo v druhé polovině roku 2011 k signifikantnímu poklesu transpiračního proudu a k redukci změn obvodů kmenů stromů pod zastřešením. Pokles transpiračního proudu a snížení změn obvodů kmenů prokázaly, že v druhé polovině sezony roku 2011 stromy prokazatelně trpěly nedostatkem vody. Transpirační proud byl měřen u 12 stromů, u šesti stromů suchem stresovaných a u šesti stromů kontrolních. Metodou měření objemových změn kmene byly měřeny vždy čtyři stromy na suchem stresovaných plochách a na plochách kontrolních byly měřeny stromy tři.



Obr. 3.2 Zastřešení experimentálních ploch v Kostelci nad Černými lesy

### 3.4.1 Označení ploch

Stresované plochy byly označeny jako P1 a P2 a plochy kontrolní KP1 a KP2. Při každém odběru bylo vybráno 10 vzorků kontrolních a 10 vzorků ze stresovaných stromů.



Obr. 3.3 Mapa umístění experimentálních ploch: P1, P2 - zastřešené plochy  
P1K, P2K- kontrolní nezastřešené plochy

### 3.5 Odběr vzorků ze stromů

Z vybraných stromů byly pomocí Presslerova nebozezu (Haglöf, Švédsko) odebrány vývrty o průměru 0,5 mm a délce 4 cm, které byly zabaleny do alobalu a uloženy do transportních přepravek se suchým ledem a v ten den převezeny do laboratoře. Vzorky byly uskladněny do doby zpracování při teplotě -70 °C.

#### 3.5.1 Odběr vzorků v roce 2010

V červnu 2010 byly odebrány vývrty s označením:

z P1 byly vybrány stromy: B, D, F, H

z P2 byly vybrány stromy: D, E, F, H, 6, 9

z KP1 byly vybrány stromy: 12, 13, 15, 18, 20

z KP2 byly vybrány stromy: 8, 11, 22, 24, 27

### 3.5.2 Odběr vzorků v roce 2011

V roce 2011 byly odebrány vývrtky 17.5. (sada vzorků JARO) a 18.7. (sada vzorků LÉTO) s označením:

JARO 2011: z P1 byly vybrány stromy: B, D, F, G, H

z P2 byly vybrány stromy: C, D, E, F, 9

z KP1 byly vybrány stromy: 12, 14, 18, 20

z KP2 byly vybrány stromy: 8, 11, 21, 22, 24, 27

LÉTO 2011: z P1 byly vybrány stromy: D, F, G, H

z P2 byly vybrány stromy: C, D, E, F, G, 9

z KP1 byly vybrány stromy: 12, 14, 18, 20

z KP2 byly vybrány stromy: 8, 11, 21, 22, 24, 27

### 3.6 Zpracování vzorků ze stromů

Zpracování bylo provedeno metodou extrakce rozpouštědlem v 2 ml vialkách. Vývrtky byly rozdrceny a 200 mg vývrtů bylo ponořeno do 1,5 ml *terc*-butyl-methyletheru s interním standardem 60 mg/ml bromdekanu. Vzorky byly extrahovány třepáním po dobu 14 hodin při laboratorní teplotě. Poté bylo k extraktům přidáno 0,3 ml 0,1M uhličitanu amonného, aby došlo k odstranění malých organických kyselin. Poté byl vzorek přefiltrován přes Pasteurovu pipetu s 0,3 g silikagelu (Sigma 60 A) překrytém 0,2 g bezvodého síranu hořečnatého. Kolonka byla vymyta 1 ml diethyletheru a eluát byl uskladněn při teplotě -20 °C. Metoda extrakce byla převzata ze studie Martin et al. 2002 [58]. Slepý pokus byl připraven s 1,5 ml *terc*-butyl-methyletherem, s interním standardem 90 µg bromdekanu a 0,3 ml 0,1M uhličitanu amonného.

### 3.7 Odběr a zpracování vzorku z lapáku

Těkavé látky uvolňované z lapáku byly odebírány headspace technikou na sorbent SuperQ® o hmotnosti 150 mg. Odběr probíhal v laboratoři tak, že lapák byl obalen potravinářskou folií, pod kterou byla vložena skleněná kapilára naplněná adsorbentem. Pomocí pumpy (SKC Limited, model 210-1002 TX, USA) byly po dobu jedné hod

zachytávány těkavé látky na adsorbent. Látky byly z adsorbentu vymyty hexanem a analyzovány pomocí GC-EAD a GC×GC-TOFMS.

### 3.8 GC×GC-TOFMS analýza

Analýzy byly prováděny za použití GC×GC-TOFMS systému LECO Pegasus IV (LECO Corp., St. Joseph, Michigan, USA). Slabě polární kapilární kolona J&W DB-5 (Agilent, Santa Clara, Kalifornie, USA; 30 m × 250 μm × 0,25 μm film) byla použita v první dimenzi. Separace v druhé dimenzi proběhla na polární kapilární koloně BPX-50 (SGE Inc., Austin, Texas, USA; 2 m × 100 μm × 0,1 μm film). Jako nosný plyn bylo použito 99,9995 % helium o konstantním průtoku 1 ml/min. Teplota nástřiku byla konstantní (220 °C). Teplotní program pro primární pec chromatografu byl následující: 40 °C po dobu 2 min, poté ohřev s gradientem 5 °C/min na 310 °C s 15 min prolongací. Program pro sekundární pec byl vyšší ve všech parametrech o 10 °C za použití identické teplotní rampy (tzv. iso-ramping mode). Perioda GC×GC modulace, horký pulz a chlazení, byla nastavena na 5, 0,8 a 1,7 s. Přechodová kapilára (transfer-line) měla po dobu analýzy teplotu 260 °C. Teplota iontového zdroje byla 220 °C s napětím -70 eV na vlákně zdroje. Sběr dat z TOFMS detektoru byl nastaven na 100 Hz (100 plných spekter za sekundu) pro rozsah hmot 29 – 400 Da. Analyzovány byly vzorky o objemu 1 μl injektované pomocí automatického dávkovače. Sada standardů alkanů C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub> byla injektována samostatně za stejných experimentálních podmínek pro výpočet lineárních retenčních indexů. Naměřená data byla následně zpracována, vyhodnocena a vizualizována (2D a 3D chromatogramy) pomocí software LECO ChromaTOF. Při vyhodnocování byla použita vlastní knihovna získaná naměřením standardů, standardní knihovna spekter NIST (National Institute of Standards and Technology) a porovnání spekter s literaturou. [59]

### 3.9 GC-EAD-FID analýza

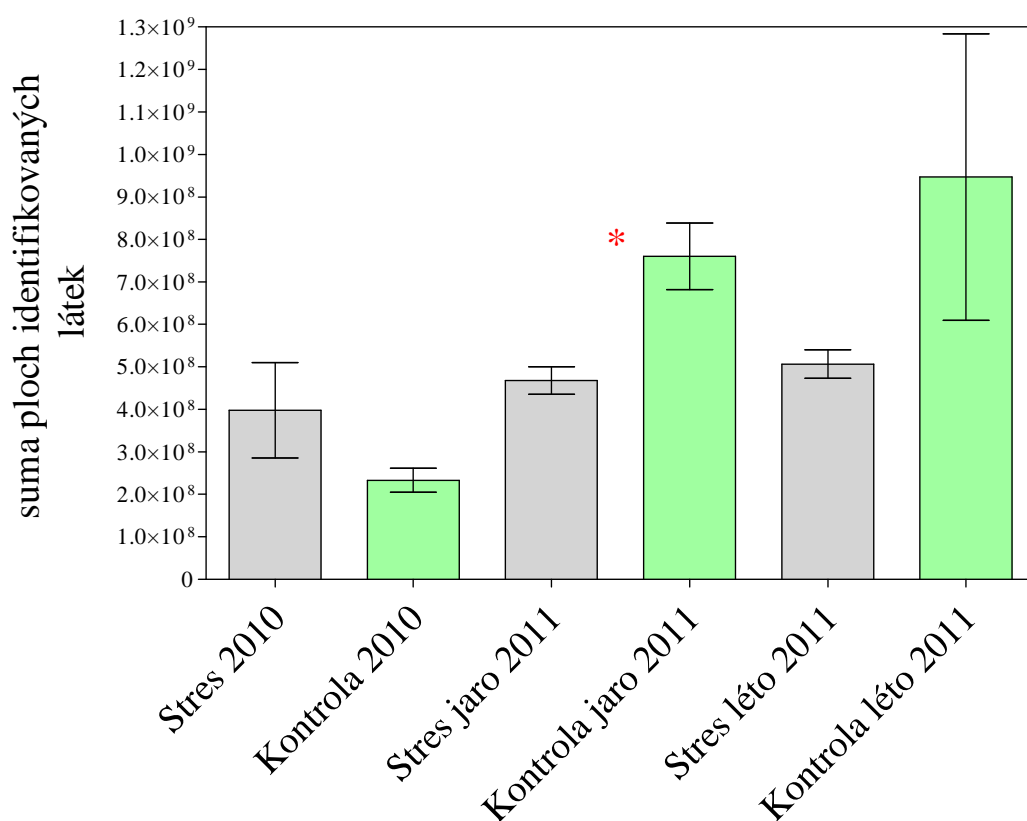
K identifikaci antenálně aktivních látek ve vzorcích byla použita metoda plynové chromatografie s elektroantenální detekcí. V těchto pokusech bylo používáno tykadlo samců *I. typographus*. Brouci byli narkotizováni a dekapitováni. Oddělená hlava byla rozpůlena žiletkou tak, aby každá půlka nesla tykadlo. Oddělená část hlavy byla

napojena na referenční elektrodu (skleněná mikrokapilára s Ringerovým roztokem a Ag drátky spojujícími Ringerův roztok s aparaturou). Apikální část tykadla byla spojena s podobně konstruovanou registrační elektrodou. Vzorky získané pomocí extrakce nebo pomocí dynamické headspace byly nastříknuty do plynového chromatografu HP 5890 s kolonou DB-5 ve spitless režimu. Nosný plyn (He) protékající systémem (1 ml/min) a obsahující separované sloučeniny byl rozdělen na dva proudy, z nichž jeden proud směřoval k tykadlu (biologickému detektoru) a druhý k plamenově-ionizačnímu detektoru (FID). Parametry měření: teplota nástřiku 200 °C a teplota detektoru 260 °C, průtok helia konstantní 1ml/min; teplotní program primární kolony 40 °C po dobu 2 minut, poté ohřev s gradientem 10 °C/min na 270 °C s 10 min prolongací. Sada standardů alkanů C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub> byla injektována samostatně a i společně s eluáty vzorků pro výpočet lineárních retenčních indexů. Tyto retenční charakteristiky byly následně použity k porovnání antenální aktivity extraktů se syntetickými standardy a pro korelaci GC-EAD a GC×GC-TOFMS.

## 4 Výsledky

### 4.1 Celkový obsah identifikovaných látek ve vzorcích

Pro porovnání rozdílů mezi stresovanými a kontrolními stromy byly vypočítány sumy ploch všech identifikovaných látek v dané sérii viz obrázek 4.1. Ve vzorcích z roku 2010 bylo započítáno 25 látek, ve vzorcích JARO 2011 bylo započítáno 33 látek a ve vzorcích LÉTO 2011 bylo započteno 36 látek. Započítané látky jsou v tabulce 4.1. Grafické zpracování bylo provedeno pomocí sloupcové statistiky pomocí software Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornie, USA).



Obr. 4.1 Zobrazení kvantitativních rozdílů v jednotlivých sadách vzorků

Provedením t-testu na hladině významnosti 0,05 bylo zjištěno, že rozdíl sumy ploch u vzorků získaných ze stresovaných stromů a stromů kontrolních v roce 2010 a vzorků LÉTO 2011 není statisticky významný. Ve vzorcích JARO 2011 bylo pomocí t-testu na hladině významnosti 0,05 zjištěno, že rozdíl, který je vyznačen červenou hvězdičkou, je



statisticky významný. Z obrázku 4.1 vyplývá, že v obou odběrech roku 2011 bylo množství terpenických látek ve vzorcích stresovaných stromů nižší než ve vzorcích kontrolních stromů.

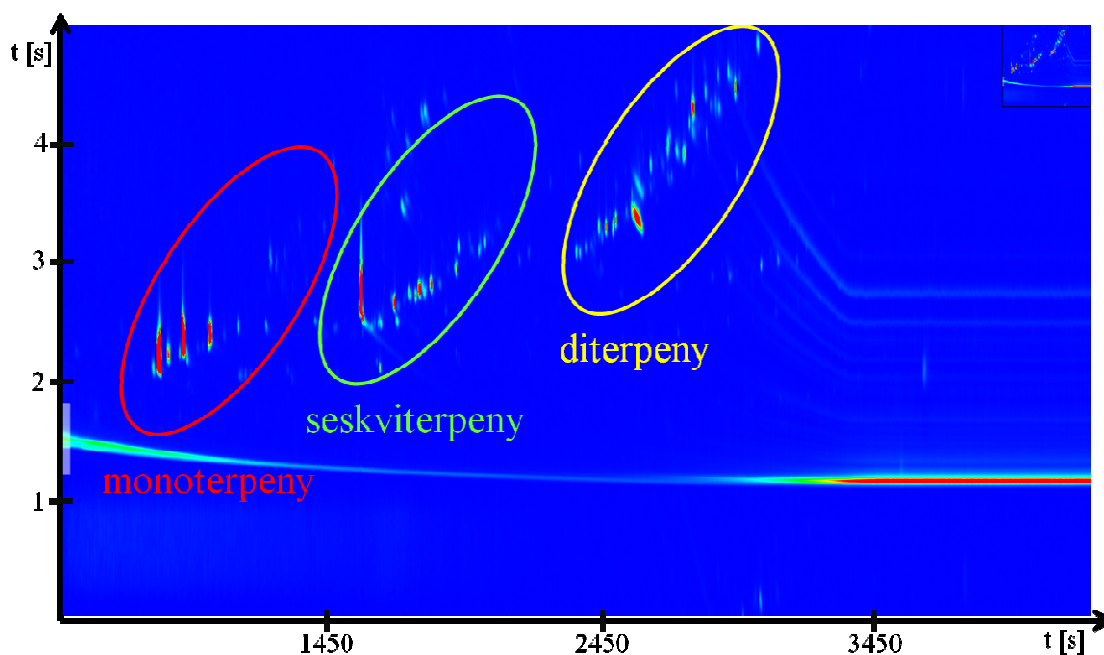
Tab. 4.1 Přehled identifikovaných látek ve vzorcích

	látky	2010	JARO - 2011	LÉTO-2011
MONOTERPENY	tricyklen	+	+	+
	$\alpha$ -pinen	+	+	+
	kamfen	+	+	+
	thujadien	-	+	+
	sabinen	+	+	+
	$\beta$ -pinen	+	+	+
	myrcen	+	+	+
	$\Delta^3$ -karen	+	+	+
	<i>p</i> -cymen	-	+	+
	limonen	+	+	+
	$\beta$ -felandren	+	+	+
	$\gamma$ -terpinen	+	+	+
	sabinenhydrát	-	+	+
	terpinolen	+	+	+
	kafr	-	-	+
	<i>trans</i> -pinokamfon	-	-	+
	$\alpha$ -terpineol	-	+	+
	D-verbenon	-	+	+
SESKVITERPENY	$\alpha$ -terpinylacetát	+	+	-
	$\alpha$ -kubeben	+	+	+
	$\alpha$ -longipinen	+	+	+
	$\alpha$ -kopaen	+	+	+
	$\beta$ -kubeben	+	+	+
	$\alpha$ -gurjunen	+	+	+
	longifolen	+	+	+
	Z- karyofylen	+	+	+
	<i>cis</i> - $\alpha$ -bergamoten	+	+	+
	seskvisabinen	-	+	+
	$\alpha$ -humulen	+	+	+
	$\gamma$ -kadinen	+	+	+
	germakren D	+	+	+
	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoten	-	-	+
	$\delta$ -kadinen	+	+	+
	$\gamma$ -bisabolen	-	-	+
	$\alpha$ -kadinen	+	+	+
	1,6-germacradien-5-ol	-	+	+
	$\alpha$ -kadinol	-	+	+

Látky v tabulce 4.1 s označením + se ve vzorcích vyskytovaly, látky s označením - se ve vzorcích nevyskytovaly, a tak nebyly započítány do celkové sumy ploch.

## 4.2 Identifikované látky

Analyzované vzorky všech odběrů obsahovaly 3 skupiny látek – monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny, které na záznamu z GC×GC chromatogramu byly rozděleny do zřetelně vymezených oblastí viz obr. 4.2

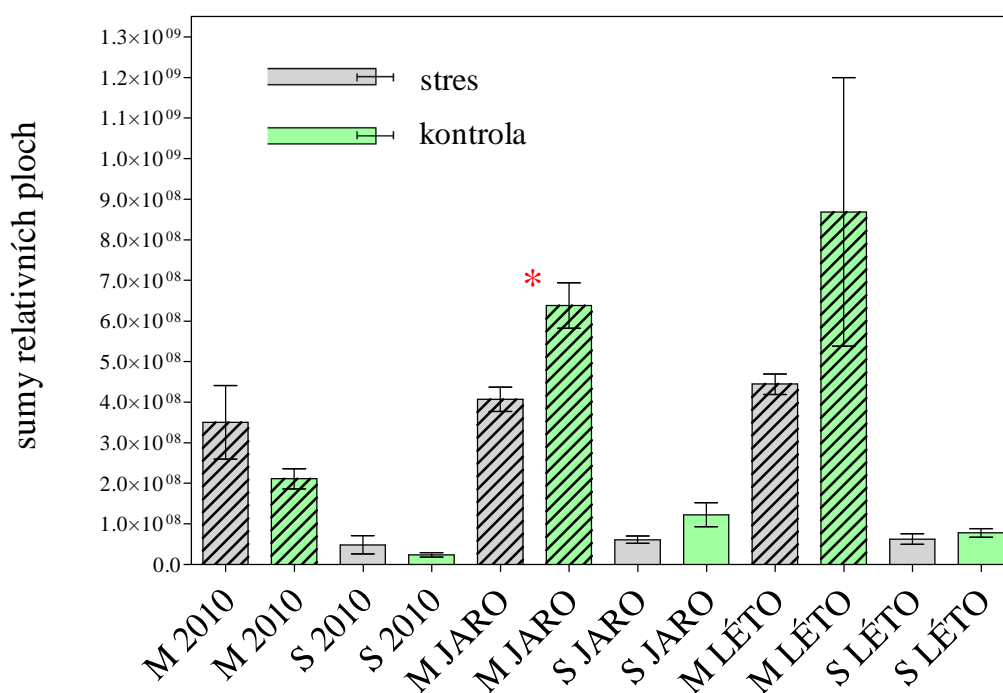


Obr. 4.2 Složení těkavých látek uvolňovaných ze vzorků vzrostlých stromů

Ve vzorcích z let 2010 a 2011 bylo identifikováno celkem 37 látek (18 monoterpenů a 19 seskviterpenů) viz tab. 4.2, které se vyskytovaly ve vzorcích dané série více než 5x a jejich relativní plocha byla větší než 500 000. Látky přítomné v menším množství a ani náhodné výskyty těchto látek nejsou v tabulce obsaženy. V tabulce jsou uvedené retenční časy na první koloně (RT1), druhé koloně (RT2), experimentálně zjištěné  $I_R$  a jejich porovnání s literaturou ( $I_{Rlit}$ ).

Koncentrace monoterpenů v analyzovaných vzorcích byla 7x a vícekrát vyšší než koncentrace seskviterpenů. Diterpeny nebyly analyzovány.

Porovnání obsahu monoterpenů a seskviterpenů ve vzorcích je zobrazeno na obr. 4.3.



Obr. 4.3 Poměr zastoupení monoterpenů a seskviterpenů v suchem stresovaných a kontrolních stromech

Na obrázku 4.3 je zobrazen poměr zastoupení monoterpenů a seskviterpenů v suchem stresovaných a kontrolních stromech. Monoterpeny jsou označeny M a jsou zobrazeny vyšrafovanými sloupci, seskviterpeny jsou označeny S. Za příslušným značením vzorku je zároveň uveden termín odběru, přičemž JARO a LÉTO se týká vzorků odebraných v roce 2011.

U monoterpenů z odběrů JARO 2011 byl provedením t-testu prokázán statistický rozdíl mezi stresovanými a kontrolními stromy na hladině významnosti 0,05, který je vyznačen červenou hvězdičkou. Zastoupení monoterpenů je ve vzorcích sedmkrát a vícekrát vyšší než zastoupení seskviterpenů.

Tab. 4.2 Seznam identifikovaných látek ve vzorcích

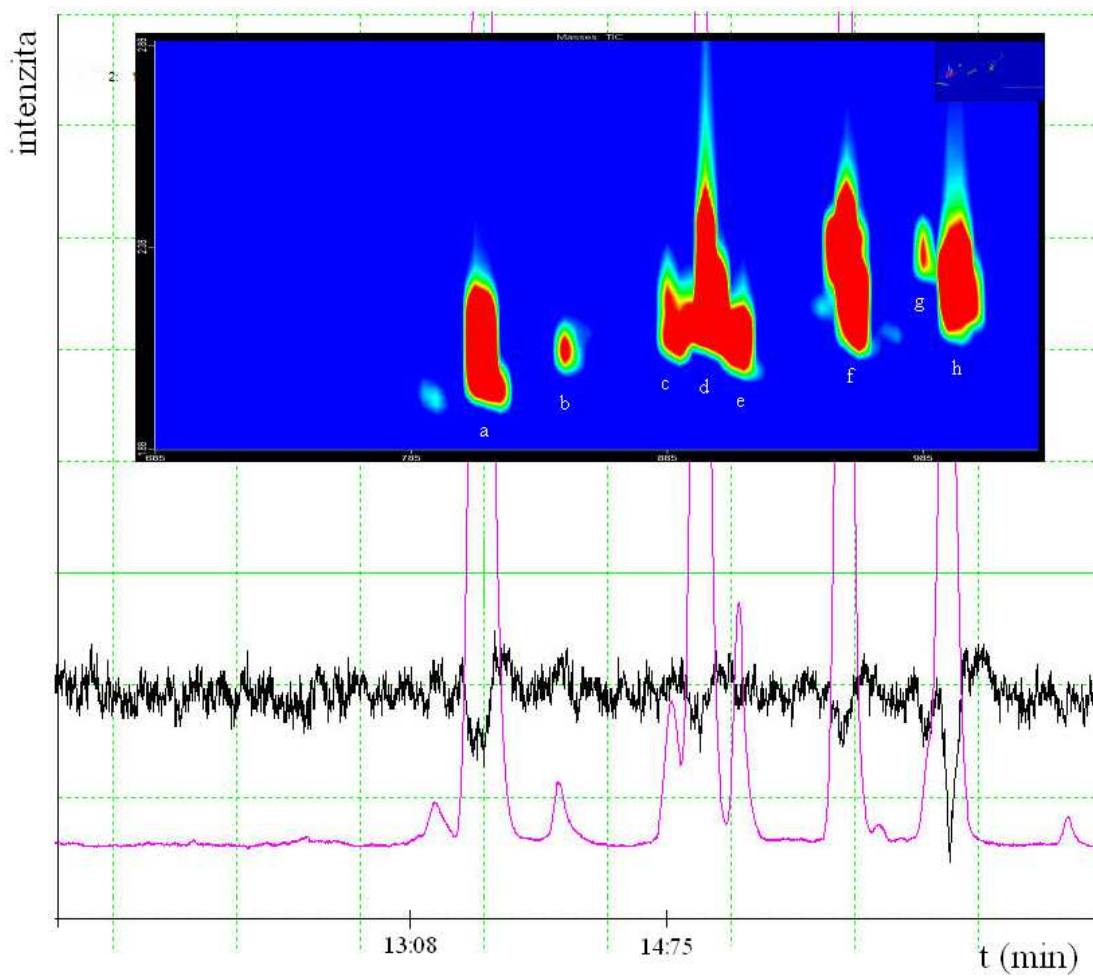
	látká	RT1 [s]	RT2 [s]	$I_R$	$I_{R-lit} *$
MONOTERPENY	tricyklen	795	2,000	925	926
	$\alpha$ -pinen	810	2,100	933	939
	kamfen	845	2,120	952	954
	thujadien	855	2,130	958	960
	sabinen	890	2,150	976	975
	$\beta$ -pinen	900	2,200	982	979
	myrcen	915	2,070	990	990
	$\Delta^3$ -karen	960	2,130	1014	1011
	<i>p</i> -cymen	990	2,270	1030	1024
	limonen	995	2,160	1033	1029
	$\beta$ -felandren	1000	2,220	1036	1029
	$\gamma$ -terpinen	1050	2,200	1063	1059
	sabinenhydrát	1080	2,430	1075	1070
	terpinolen	1100	2,240	1092	1088
	kafr	1220	2,720	1157	1146
	<i>trans</i> -pinokamfon	1260	3,010	1171	1162
	$\alpha$ -terpineol	1310	2,750	1204	1188
	verbenon	1325	2,970	1218	1205
SESKVITERPENY	$\alpha$ -terpinylacetát	1550	2,500	1356	1349
	$\alpha$ -kubeben	1555	2,260	1359	1348
	$\alpha$ -longipinen	1570	2,240	1369	1352
	$\alpha$ -kopaen	1605	2,320	1391	1376
	$\beta$ -kubeben	1620	2,360	1401	1388
	$\alpha$ -gurjunen	1650	2,400	1421	1409
	longifolen	1665	2,420	1431	1407
	Z-karyofylen	1675	2,450	1438	1408
	<i>cis</i> - $\alpha$ -bergamoten	1690	2,360	1448	1412
	seskvisabinen	1710	2,600	1451	1459
	$\alpha$ -humulen	1730	2,440	1475	1454
	$\gamma$ -kadinen	1755	2,400	1491	1513
	germakren D	1765	2,560	1498	1485
	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoten	1810	2,700	1516	1434
	$\delta$ -kadinen	1815	2,500	1533	1513
	$\gamma$ -bisabolen	1820	2,700	1523	1515
	$\alpha$ -kadinen	1845	2,540	1555	1538
	1.6-germakradien-5-ol	1905	2,860	1591	-
	$\alpha$ -kadinol	2025	3,170	1675	1640

\* Adams [59]

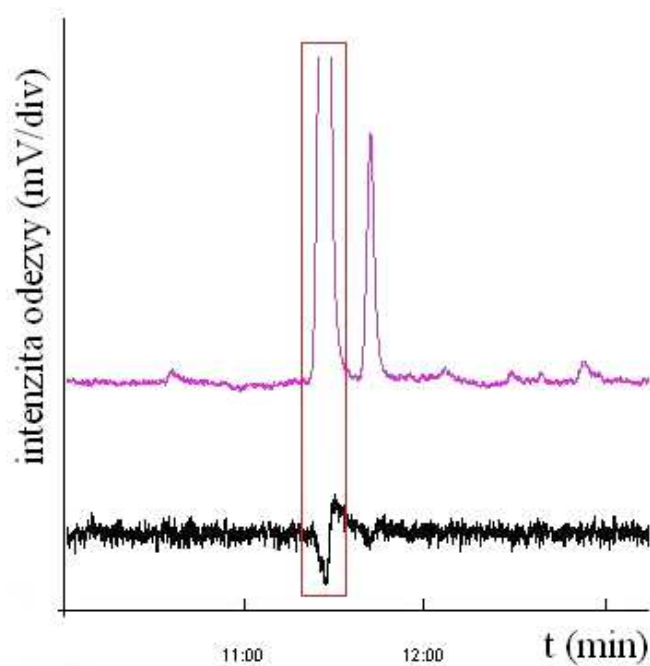
### 4.3 Identifikace antenálně aktivních látek

Stanovení antenální aktivity bylo provedeno v roce 2010 metodou GC-EAD-FID. Biologickým detektorem bylo tykadlo lýkožrouta *I. typographus*. Pomocí GC-EAD bylo zjištěno, že 11 látek, které jsou součástí těkavých látek pryskyřice, má schopnost vyvolávat na tykadlech kůrovců významné podráždění. Tyto antenálně aktivní látky mají potenciál ovlivňovat chování *I. typographus*.

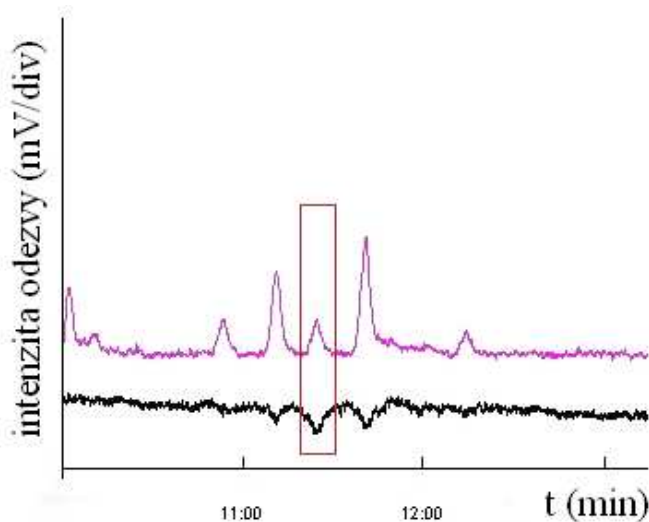
Součástí GC-EAD-FID analýzy byla i analýza série uhlovodíků C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>, aby bylo možné pro jednotlivé EAD aktivní látky vypočítat lineární retenční indexy a orientovat se následně při identifikaci v příslušné oblasti GC×GC-MS. Identifikace aktivních látek byla založena na hledání látek v oblastech GC×GC-MS chromatogramů, které korespondovaly s oblastmi antenální aktivity. Na obr. 4.4 je zobrazeno srovnání korespondujících částí záznamu z GC-FID-EAD a GC×GC-MS. Látky byly identifikovány na základě srovnání MS spekter s knihovnou spekter NIST a na základě shody příslušných retenčních indexů ( $I_R$ ). Následně byla identita látek a jejich antenální aktivita ověřena srovnáním se syntetickými standardy (viz. obrázek 4.5 a 4.6).



Obr. 4.4 Srovnání korespondujících částí záznamu z GC-FID-EAD a GC×GC-MS: fialově je zobrazen záznam z FID, černou barvou je zaznamenána odpověď tykadla *I. typographus*. V modrém pozadí je záznam z GC×GC, kde byly identifikovány látky: a)  $\alpha$ -pinen, b) kamfen, c) sabinen, d)  $\beta$ -pinen, e) myrcen, f)  $\Delta^3$ -karen, g) *p*-cymen h)  $\beta$ -felandren



Obr. 4.5. Záznam z analýzy GC-FID-EAD: fialově je zobrazen záznam z FID, černou barvou je zaznamenána odpověď tykadla *I. typographus*. V červeném rámečku je zvýrazněna odpověď tykadla na syntetický standard *trans*-pinokamfonu. Nastavení parametrů intenzity u EAD bylo 0,5 mV pro EAD, 20 mV pro FID.



Obr. 4.6. Záznam z analýzy GC-FID-EAD vzorku z lapáku: fialově je zobrazen záznam z FID, černou barvou je zaznamenána odpověď tykadla *I. typographus*. V červeném rámečku je zvýrazněna odpověď tykadla na *trans*-pinokamfon. Nastavení parametrů intenzity u EAD bylo v 0,5 mV pro EAD, 20 mV pro FID.



Po identifikaci antenálně aktivních látek bylo následně provedeno stanovení jejich obsahu ve vzorcích odebraných stresovaných a kontrolních stromů. Statistická analýza, která měla za cíl zjistit, zda se liší obsahy antenálně aktivních mezi porovnávanými vzorky neprokázala statisticky významný rozdíl.

Tab. 4.3 Identifikované antenálně aktivní látky ve vzorcích LÉTO 2011 pomocí GC×GC-TOFMS

	RT1 [s]	RT2 [s]	$I_R$
$\alpha$ -pinen	810	2,100	933
kamfen	845	2,120	952
$\beta$ -pinen	900	2,200	982
myrcen	915	2,070	990
$\Delta^3$ -karen	960	2,130	1014
<i>p</i> -cymen	990	2,270	1030
limonen	995	2,160	1033
$\beta$ -felandren	1000	2,220	1036
kafr	1220	2,720	1157
<i>trans</i> -pinokamfon	1260	3,010	1171
verbenon	1325	2,970	1218

Antenálně aktivní látky uvedené v tabulce 4.3 se vyskytovaly ve vzorcích stresovaných i kontrolních stromů.

#### 4.4 Antenálně aktivní látky identifikované v lapáku

Pomocí GC×GC-TOFMS bylo identifikováno 15 látek viz tab. 4.4., u kterých byla GC-EAD analýzou prokázána antenální aktivita.

Tab. 4.4 Přehled antenálně aktivních látek identifikovaných v poleni *Picea abies*

	RT1 [s]	RT2 [s]	<i>I<sub>R</sub></i>
α-pinen	830	2,020	953
kamfen	850	2,180	964
β-pinen	900	2,320	990
myrcen	915	1,990	998
Δ3-karen	960	2,610	1022
<i>p</i> -cymen	985	2,420	1035
limonen	995	2,350	1040
<b>1,6-cineol</b>	<b>1010</b>	<b>2,540</b>	<b>1048</b>
β-felandren	1015	2,230	1051
<b>nonanal</b>	<b>1135</b>	<b>2,430</b>	<b>1115</b>
kafr	1220	2,990	1164
<b>terpinen-4-ol</b>	<b>1285</b>	<b>2,610</b>	<b>1201</b>
<i>trans</i> -pinokamfon	1340	2,670	1233
<b><i>cis</i>-pinokamfon</b>	<b>1355</b>	<b>2,480</b>	<b>1242</b>
verbenon	1320	3,150	1222

Při analýze polena nebyla proměřena řada alkanů. Látky byly identifikovány na základě MS spekter. V poleni bylo nalezeno o 4 antenálně aktivní látky více, než u vzrostlých suchem stresovaných stromů: 1,6-cineol, nonanal, *cis*-pinokamfon a terpinen-4-ol, v tabulce 4.4 jsou vyznačeny tučně. Tyto 4 uvedené látky byly nalezeny pouze v emanacích lapáku.

## 4.5 Kvantitativní analýza látek odebraných v letech 2010 a 2011

Přehled identifikovaných monoterpenů a seskviterpenů a jejich relativní zastoupení je uveden v tab. 4.3. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty zastoupení látky v % (100% = suma ploch všech vyhodnocených látek v dané sérii). Látky vykazující antenální aktivitu jsou tučně zvýrazněny. V tabulce 4.3 jsou podobně jako v tabulce 4.2, uvedeny látky vyskytující se v analýzách dané série více než 5× a jejichž relativní plocha byla větší než 500 000.

Tab. 4.5 Průměrné hodnoty zastoupení látky v sadě vzorků v %

	2010		JARO - 2011*		LÉTO-2011*		
	látky	S	K	S	K	S	K
MONOTERPENY	tricyklen	0,89	0,96	0,76	0,62	0,83	0,84
	<b>α-pinen</b>	<b>36,50</b>	<b>40,21</b>	<b>37,78</b>	<b>37,51</b>	<b>37,96</b>	<b>40,00</b>
	<b>kamfen</b>	<b>1,63</b>	<b>2,30</b>	<b>2,04</b>	<b>1,83</b>	<b>1,79</b>	<b>2,43</b>
	thujadien	-	-	0,33	0,05	0,12	0,19
	sabinen	1,53	0,94	1,34	1,34	1,13	1,09
	<b>β-pinen</b>	<b>27,32</b>	<b>26,30</b>	<b>33,76</b>	<b>29,74</b>	<b>30,62</b>	<b>30,14</b>
	<b>myrcen</b>	<b>2,70</b>	<b>1,88</b>	<b>2,10</b>	<b>3,31</b>	<b>2,72</b>	<b>3,00</b>
	<b>Δ3-karen</b>	<b>3,87</b>	<b>1,78</b>	<b>1,16</b>	<b>0,33</b>	<b>1,30</b>	<b>1,47</b>
	<b>p-cymen</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,49</b>	<b>0,23</b>	<b>0,62</b>	<b>0,35</b>
	<b>limonen</b>	<b>7,98</b>	<b>9,03</b>	<b>2,39</b>	<b>3,75</b>	<b>2,55</b>	<b>2,47</b>
	<b>β-felandren</b>	<b>6,42</b>	<b>5,41</b>	<b>5,54</b>	<b>7,89</b>	<b>7,36</b>	<b>6,05</b>
	γ-terpinen	0,40	0,41	0,31	0,24	0,29	0,25
	sabinenhydrát	-	-	0,14	0,32	0,22	0,18
	terpinolen	1,08	0,85	0,40	0,63	0,46	0,68
	<b>kafr</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,22</b>	<b>0,17</b>
	<b>trans-pinokamfon</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,12</b>	<b>0,07</b>
	α-terpineol	-	-	0,18	0,29	0,36	0,29
	<b>verbenon</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1,52</b>	<b>0,09</b>	<b>0,19</b>	<b>0,19</b>
SESKVITERPENY	α-terpinylacetát	0,20	0,37	2,60	0,85	-	-
	α-kubeben	0,17	0,14	0,15	0,16	0,15	0,14
	α-longipinen	0,41	0,33	0,40	0,60	0,64	0,64
	α-kopaen	0,32	0,25	0,30	0,12	0,27	0,14
	β-kubeben	0,25	0,15	0,13	0,09	0,16	0,16
	α-gurjunen	0,82	1,04	0,90	0,91	0,76	0,78
	longifolen	0,71	0,50	1,37	1,60	1,24	1,46
	Z- karyofylen	1,15	1,90	1,72	2,32	1,61	1,91
	cis-α-bergamoten	0,39	0,24	0,33	0,08	0,19	0,07
	seskvisabinen	-	-	0,06	0,08	0,08	0,07
	α-humulen	0,26	0,38	0,29	0,30	0,23	0,28
	γ-kadinen	0,81	0,61	0,27	0,33	0,37	0,34
	germakren D	0,75	0,28	2,05	2,92	2,00	1,93
	trans-α-bergamoten	-	-	-	-	0,12	0,07
	δ-kadinen	2,90	3,16	1,75	2,22	2,35	2,12
	γ-bisabolen	-	-	-	-	0,15	0,14
	α-kadinen	0,52	0,57	0,07	0,08	0,10	0,09
	1,6-germacradien-5-ol	-	-	1,53	2,27	1,20	1,08
α-kadinol	-	-	0,14	0,13	0,19	0,14	

\* přepočet podle interního standardu (IS)

Ve vzorcích z roku 2010 bylo identifikováno 25 látek, ze kterých vykazovalo 7 antenální aktivitu. Vzorky nebyly měřeny s interním standardem, proto jsou hodnoty procentuálního zastoupení pouze orientační, protože nejsou přepočítané jako u vzorků z roku 2011. V roce 2010 nedošlo k vyvolání míry stresu, která by byla prokázána změnou koncentrací komponent. Měřením fyziologických hodnot pomocí dendrometrů, při měření objemových změn kmene vlivem sucha bylo zjištěno, že nedošlo k významnému snížení obsahu vody. Odběr vzorků v roce 2010 sloužil k vypracování metodiky a k identifikaci jednotlivých složek směsi.

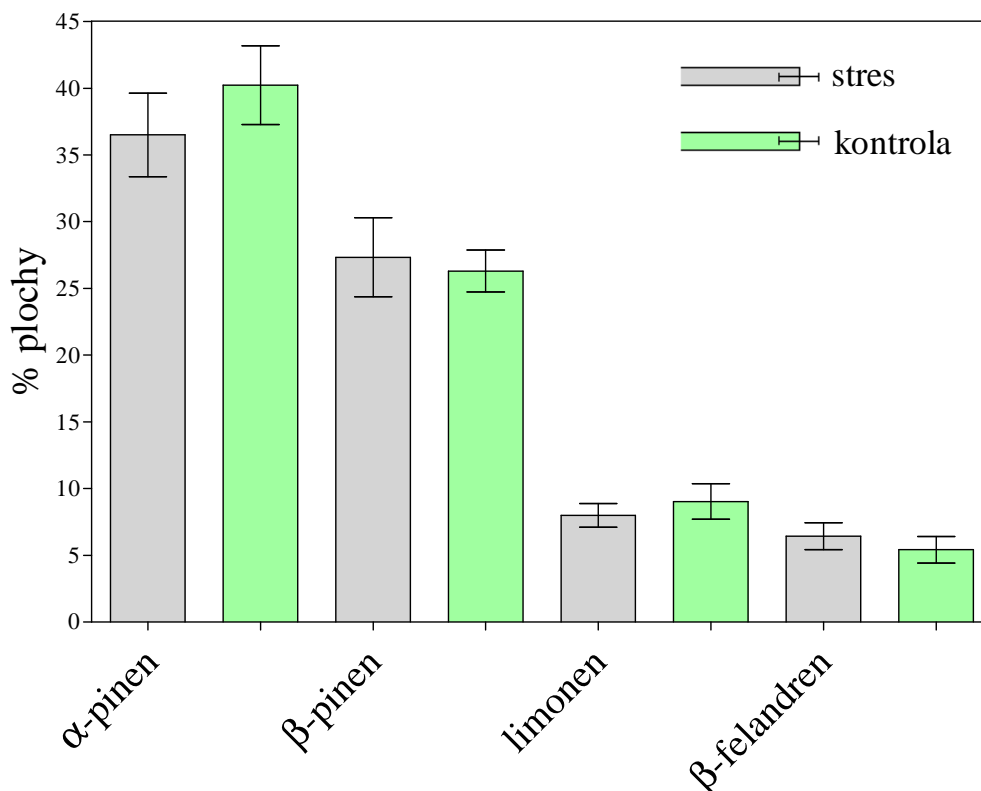
Ve vzorcích JARO 2011 bylo identifikováno 33 látek, ze kterých bylo 9 antenálně aktivních. Vzorky byly měřeny s interním standardem, tak hodnoty procentuálního zastoupení jsou přepočítané s IS. Na jaře 2011 se podařilo snížit dostupný objem vody pro vzrostlé experimentální stromy vybudováním izolačního příkopu, tím byly stromy vystaveny větší míře stresu než v roce 2010.

Vzorky odebrané v LÉTĚ 2011 by měly vykazovat nejvyšší rozdíly, neboť stromy byly vystaveny nejvyšší naměřené míře stresu, která byla ovlivněna vybudováním izolačního příkopu a také vlivem počasí, protože léto 2011, dle naměřených srážek, bylo podstatně sušší než léto 2010. Při měření objemových změn kmene bylo prokázáno, že došlo ke statisticky významnému snížení obsahu vody. Ve vzorcích z LÉTA 2011 bylo identifikováno 36 látek, ze kterých antenální aktivitu vykazovalo 11 látek.

U žádné z identifikovaných látek nebyl zjištěn kvalitativní rozdíl, všechny látky se vyskytovaly ve vzorcích experimentálních i kontrolních. Kvantitativní rozdíly mezi identifikovanými látkami u experimentálních a kontrolních vzorků jsou zpracované v kapitole 4.6 .

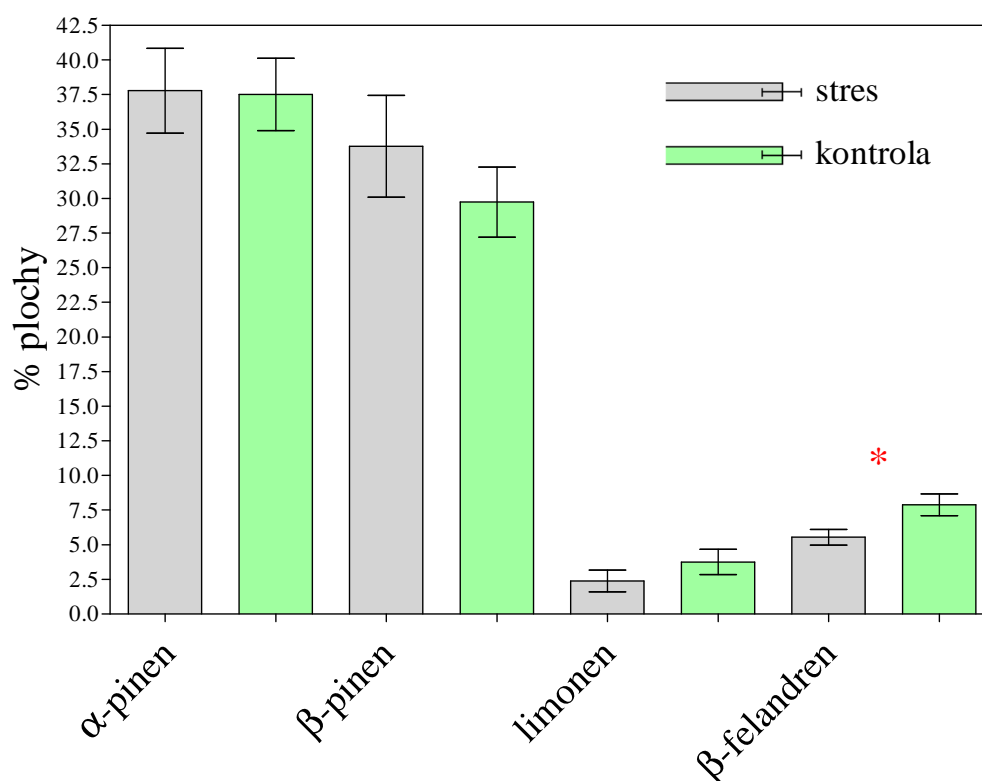
## 4.6 Přehled identifikovaných látek z let 2010 a 2011

Grafické zpracování bylo provedeno pomocí sloupkové statistiky Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornie, USA).



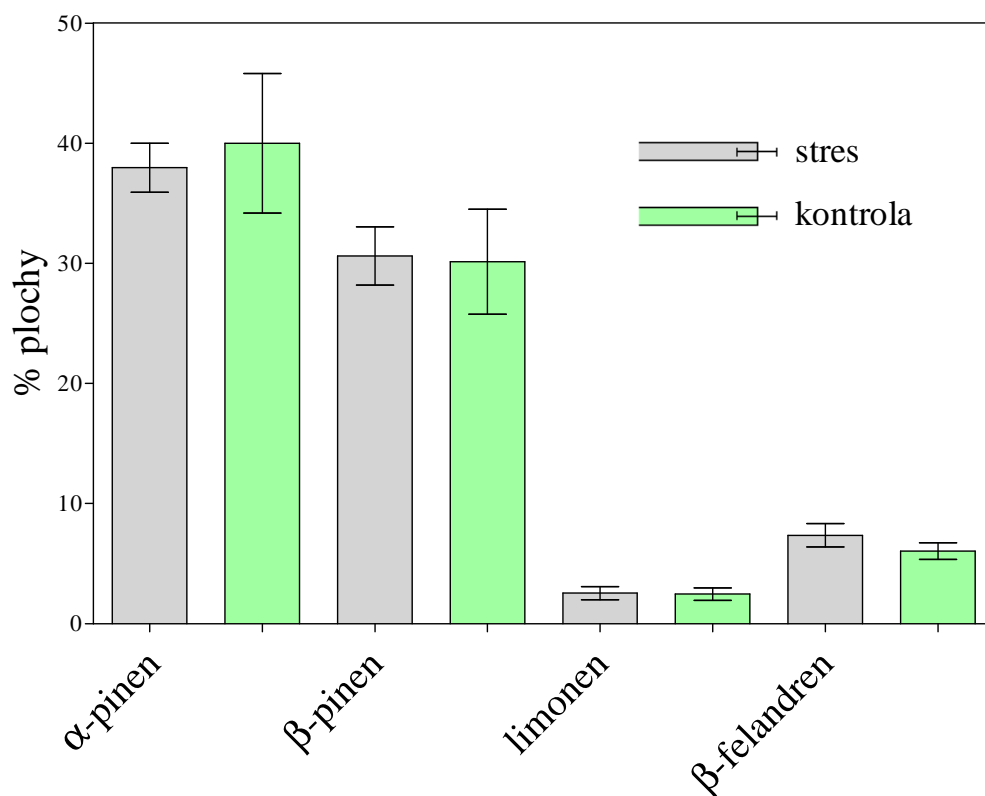
Obr. 4.7 Majoritní terpeny 2010

Zastoupení majoritních terpenů ve vzorcích z roku 2010 je zobrazeno na obr. 4.7. Šedé sloupce jsou tvořeny procentuálním zastoupením terpenů ve vzorcích ze stresovaných stromů. Zelené sloupce tvoří procentuální zastoupení terpenů ve vzorcích kontrolních. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z majoritních látek.



Obr. 4.8 Majoritní terpeny JARO 2011

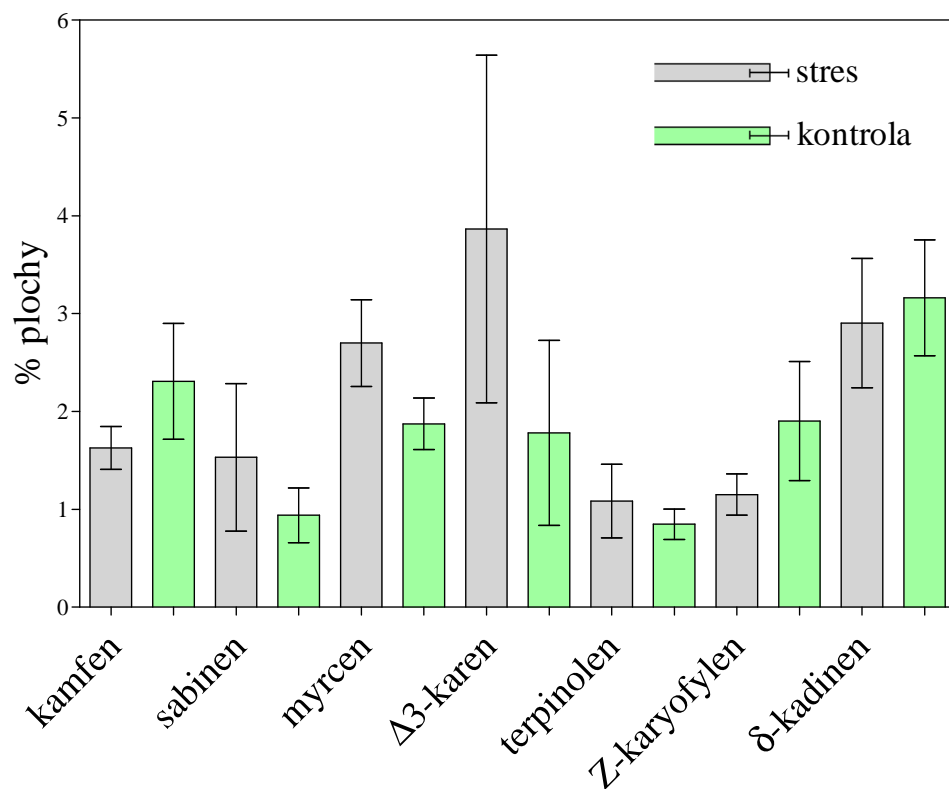
Zastoupení majoritních terpenů ve vzorcích JARO 2011 je zobrazeno na obr. 4.8. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u majoritních látek kromě  $\beta$ -felandrenu, u kterého je statisticky významný rozdíl u stresovaných a kontrolních stromů na hladině významnosti 0,05, který je vyznačen červenou hvězdičkou.



Obr. 4.9 Majoritní terpeny LÉTO 2011

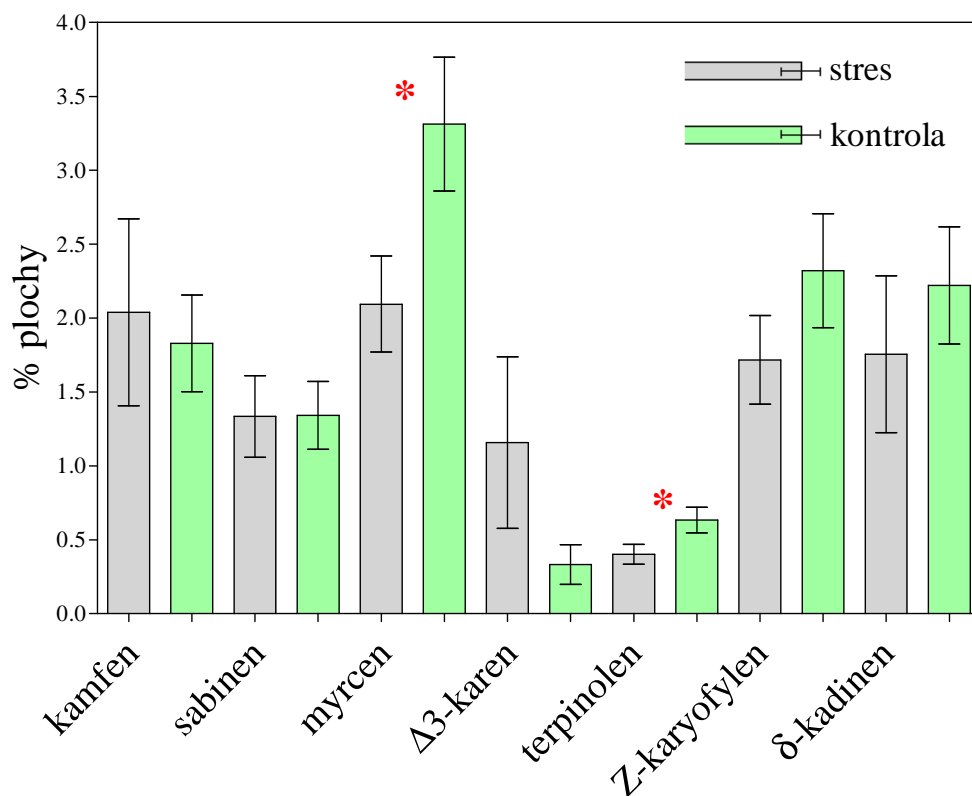
Zastoupení majoritních terpenů ve vzorcích LÉTO 2011 je zobrazeno na obr. 4.9. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z majoritních látek.





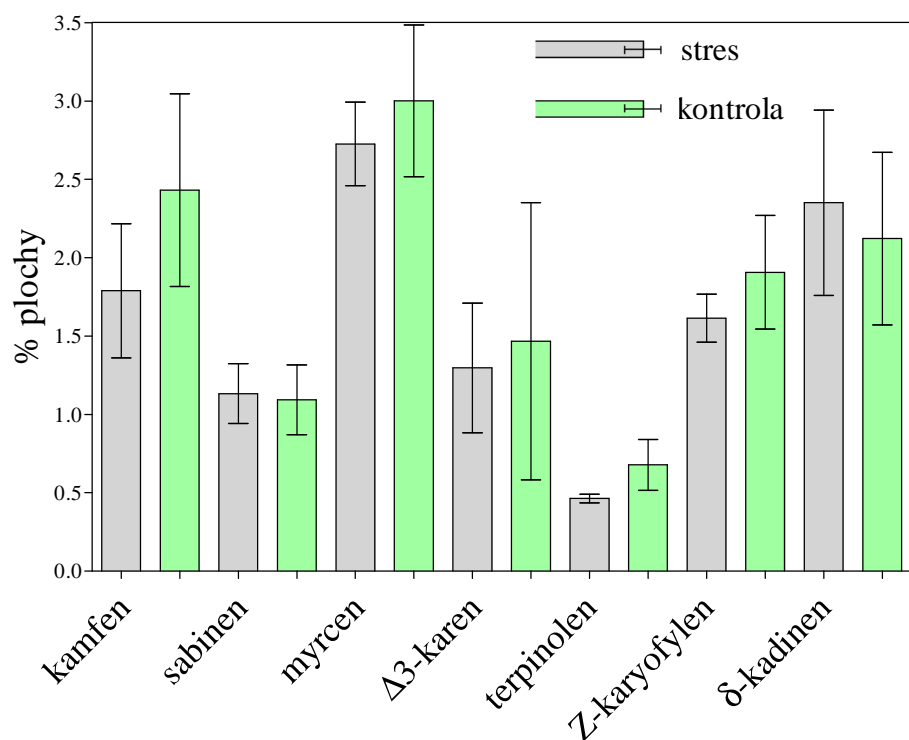
Obr. 4.10 Minoritní terpeny obsahově mezi 1-6 % plochy vybraných látek 2010

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 1-6 % plochy vybraných látek ve vzorcích z roku 2010 je zobrazeno na obr. 4.10 . Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.



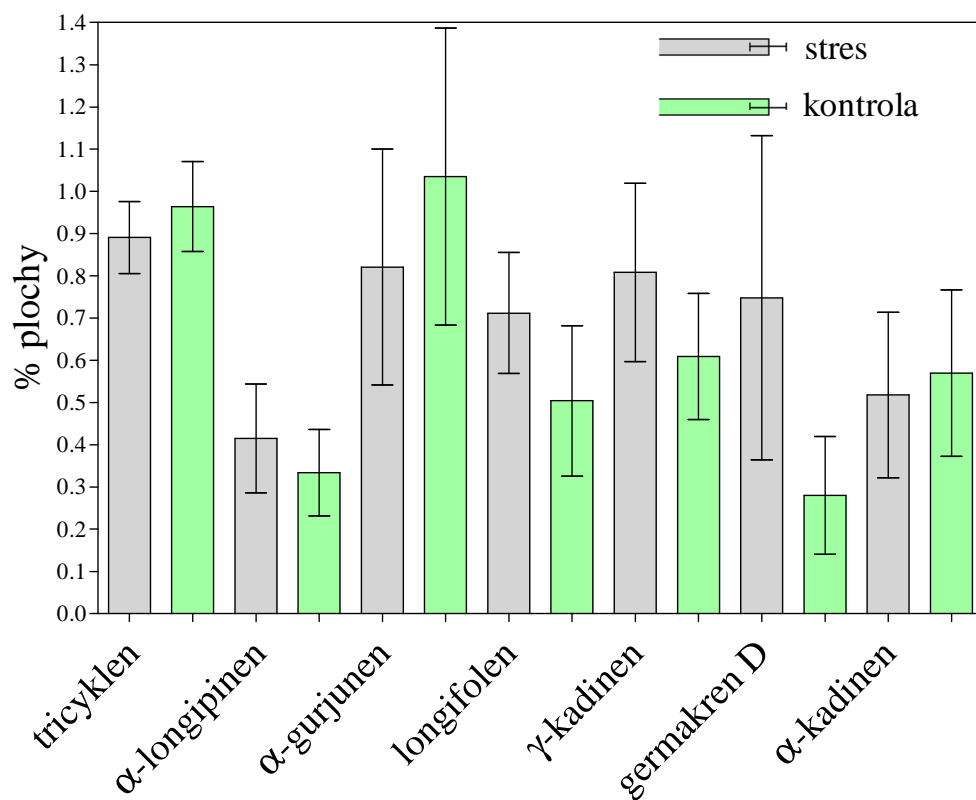
Obr. 4.11 Minoritní terpeny obsahově mezi 1-6 % plochy vybraných látek JARO 2011

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 1-6 % plochy vybraných látek ve vzorcích JARO 2011 je zobrazeno na obr. 4.11. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u uvedených minoritních látek, kromě myrcenu a terpinolenu, u kterých je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti 0,05 a je vyznačen červenou hvězdičkou.



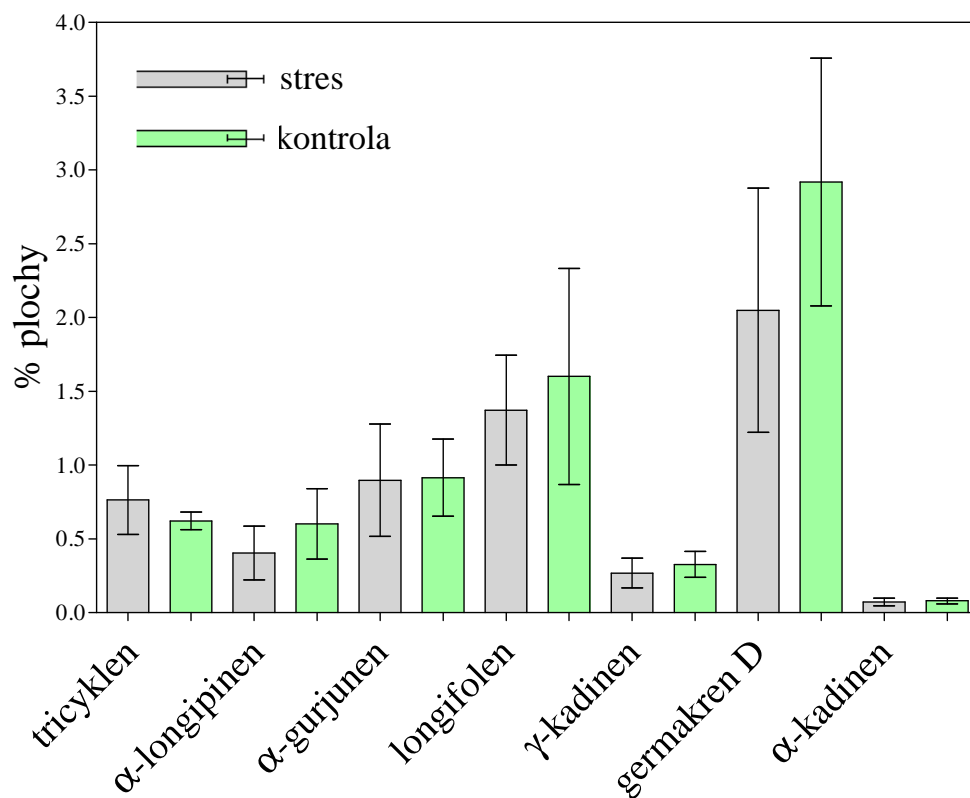
Obr. 4.12 Minoritní terpeny obsahově mezi 1-6 % plochy vybraných látek LÉTO 2011

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 1-6 % plochy vybraných látek ve vzorcích LÉTO 2011 je zobrazeno na obr. 4.12. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.



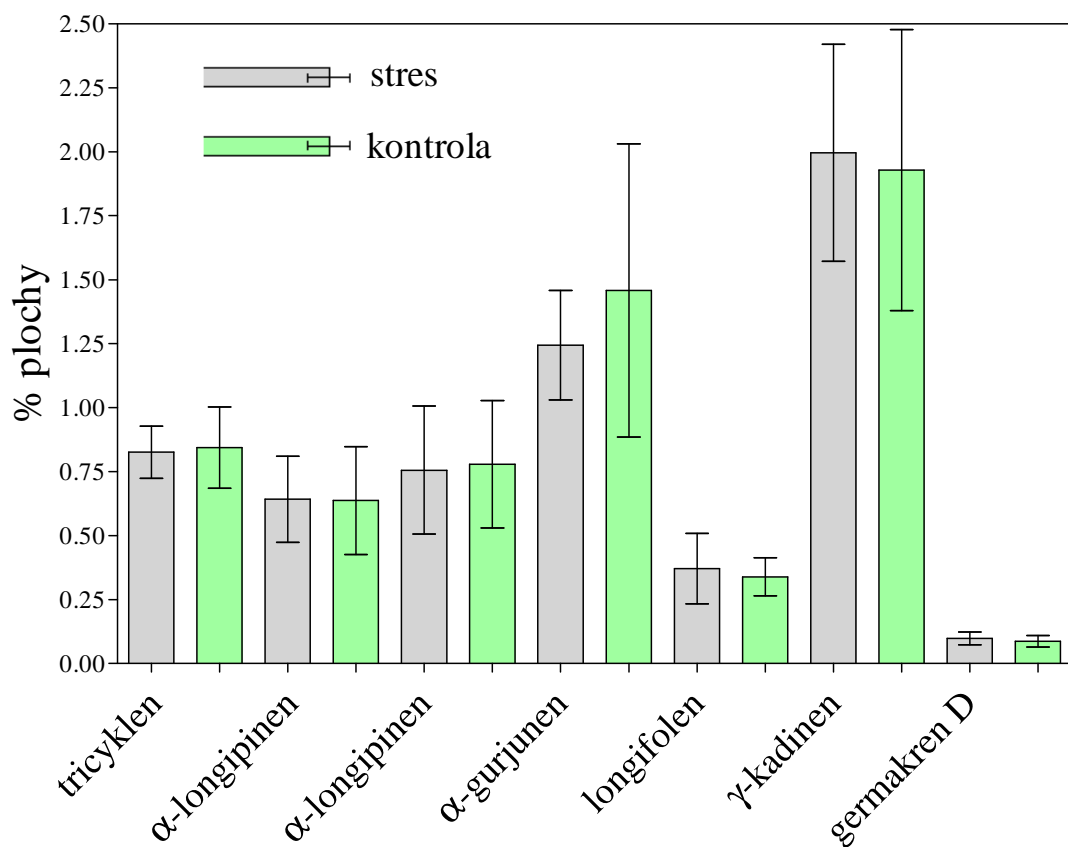
Obr. 4.13 Minoritní terpeny obsahově mezi 0,2-1,1 % plochy vybraných látek 2010

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 0,2-1,1 % plochy vybraných látek ve vzorcích z roku 2010 je zobrazeno na obr. 4.13. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.



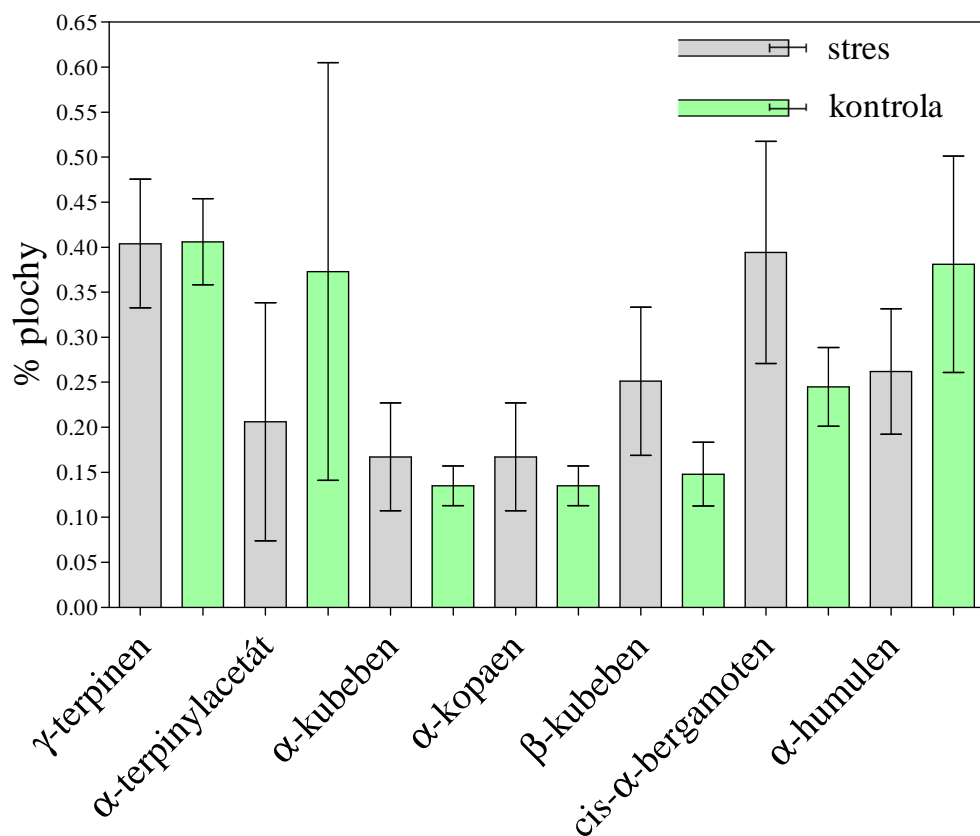
Obr. 4.14 Minoritní terpeny obsahově mezi 0,2-1,1 % plochy vybraných látek JARO 2011

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 0,2-1,1 % plochy vybraných látek ve vzorcích JARO 2011 je zobrazeno na obr. 4.14. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.



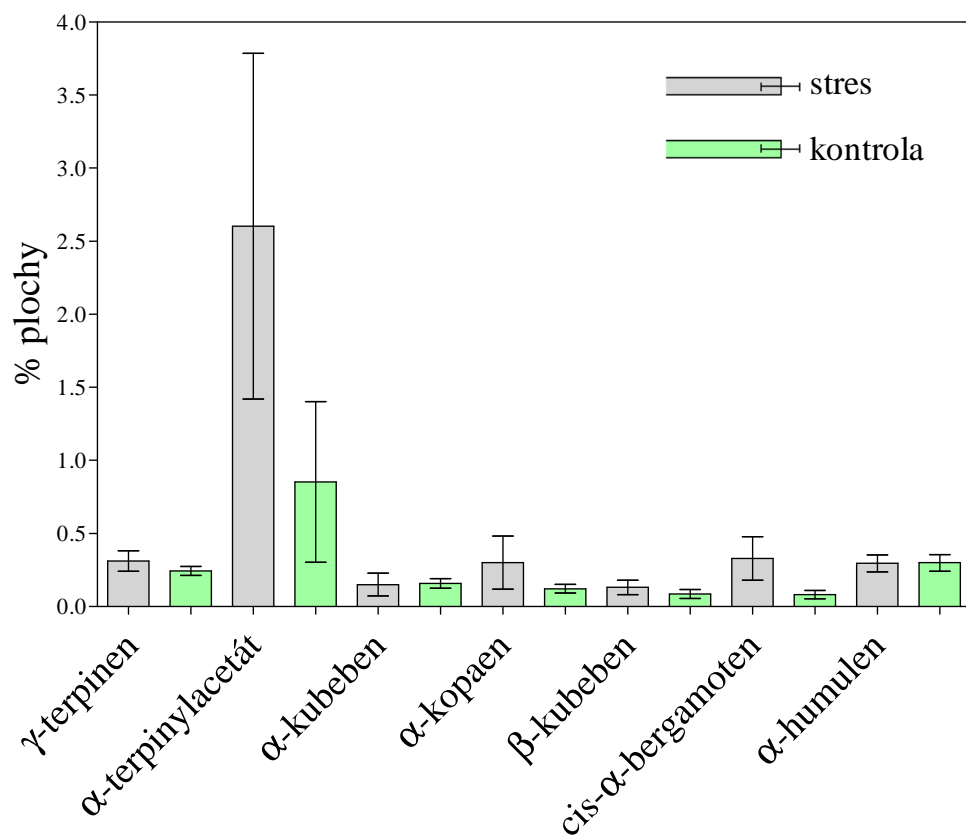
Obr. 4.15 Minoritní terpeny obsahově mezi 0,15-1,1 % plochy vybraných látek LÉTO 2011

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 0,15-1,1 % plochy vybraných látek ve vzorcích LÉTO 2011 je zobrazeno na obr. 4.15. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.



Obr. 4.16 Minoritní terpeny obsahově mezi 0,1-0,5 % plochy vybraných látek 2010

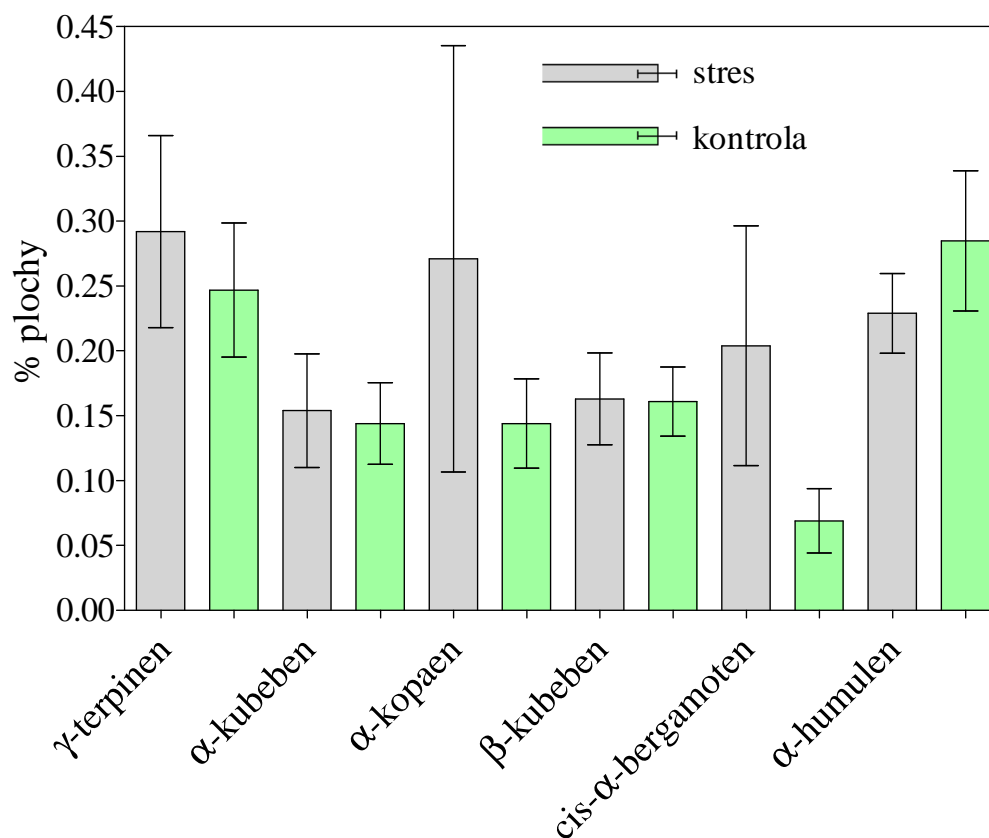
Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 0,1-0,5 % plochy vybraných látek ve vzorcích z roku 2010 je zobrazeno na obr. 4.16. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.



Obr. 4.17 Minoritní terpeny obsahově mezi 0,1-0,5 % plochy vybraných látek JARO 2011

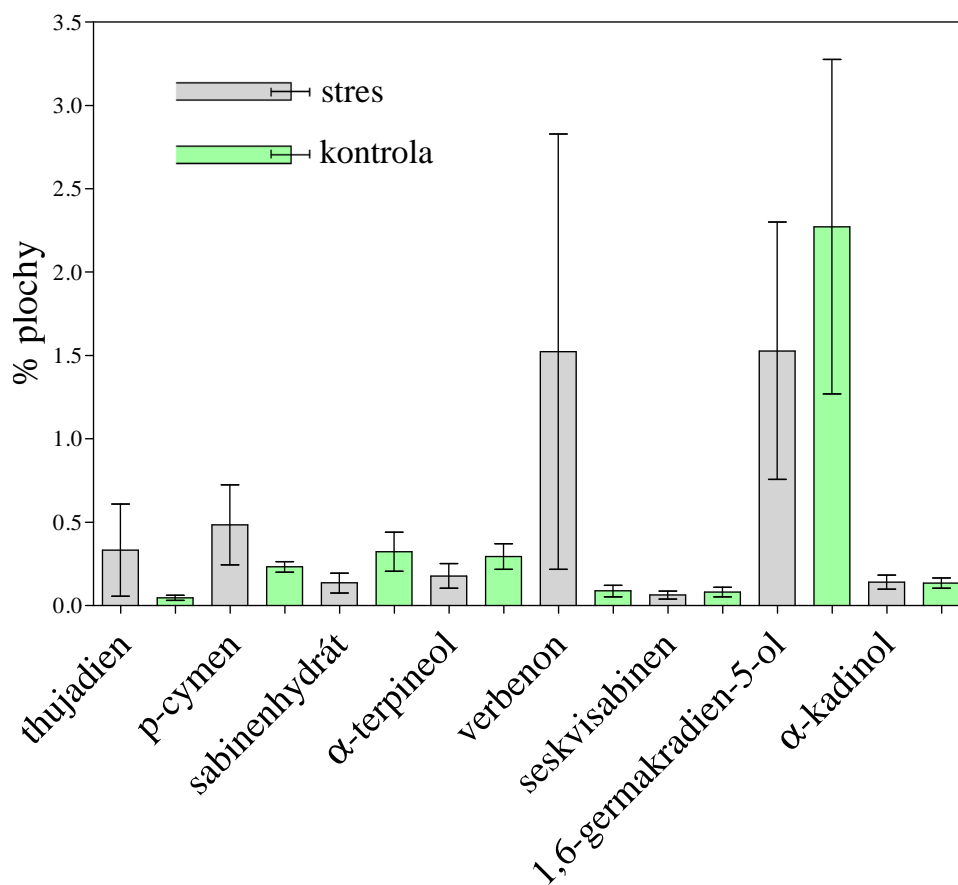
Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 0,1-0,5 % plochy vybraných látek ve vzorcích JARO 2011 je zobrazeno na obr. 4.17. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.





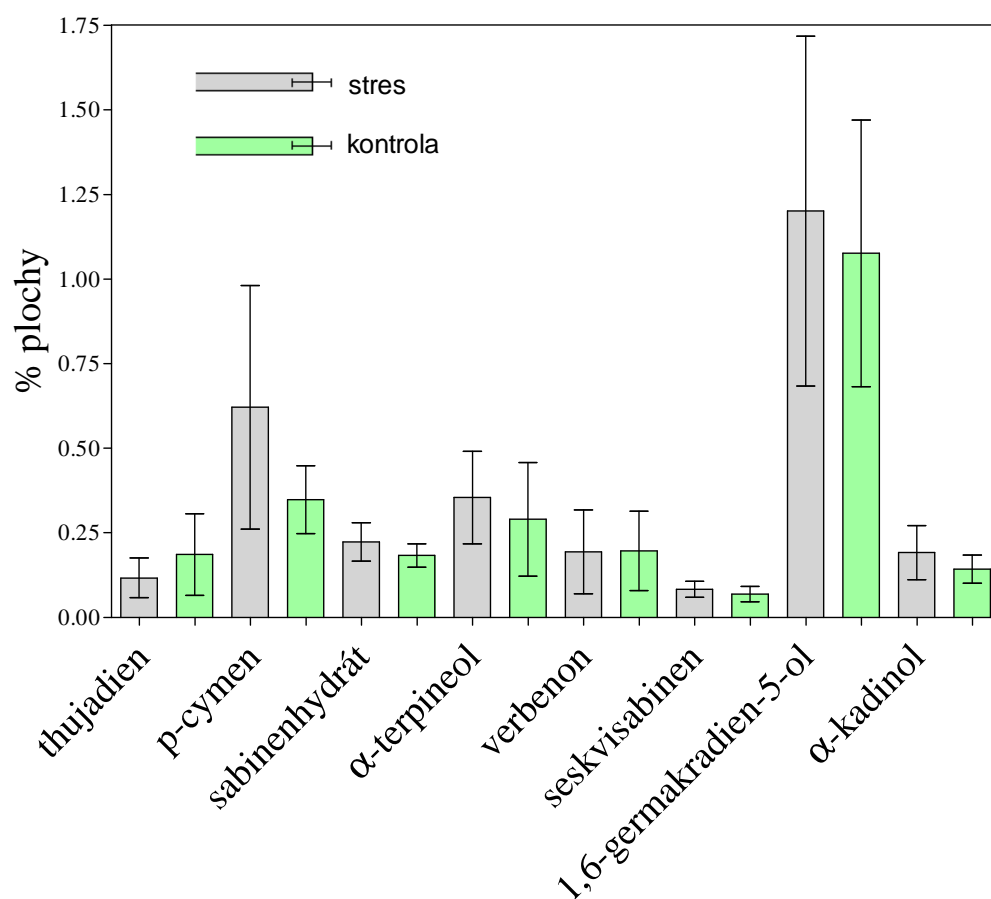
Obr. 4.18 Minoritní terpeny obsahově mezi 0,05-0,5 % plochy vybraných látek LÉTO 2011

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 0,05-0,5 % plochy vybraných látek ve vzorcích LÉTO 2011 je zobrazeno na obr. 4.18. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.



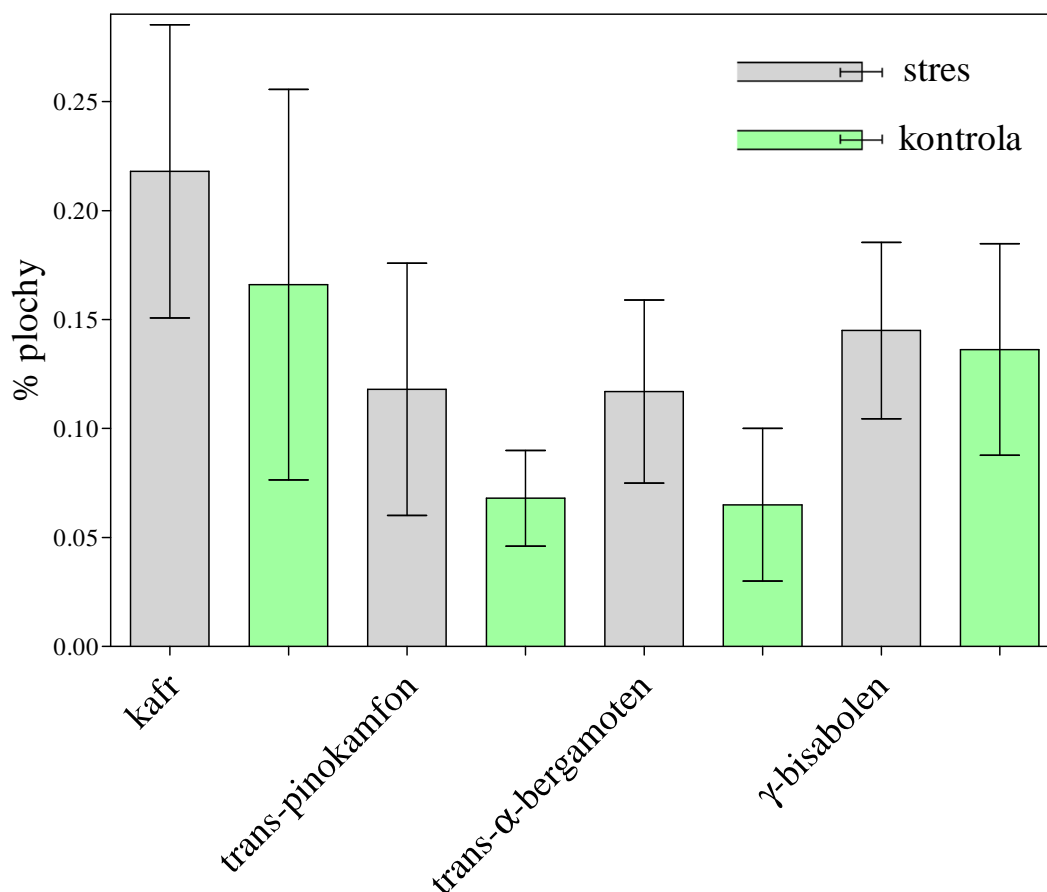
Obr. 4.19 Minoritní terpeny obsahově mezi 0-2,5 % plochy vybraných látek JARO 2011

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 0-2,5 % plochy vybraných látek ve vzorcích JARO 2011 je zobrazeno na obr. 4.19. Tyto látky se nevyskytují ve vzorcích z roku 2010. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.



Obr. 4.20 Minoritní terpeny obsahově mezi 0-2,5 % plochy vybraných látek LÉTO 2011

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 0-2,5 % plochy vybraných látek ve vzorcích LÉTO 2011 je zobrazeno na obr. 4.20. Tyto látky se nevyskytují ve vzorcích z roku 2010. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.

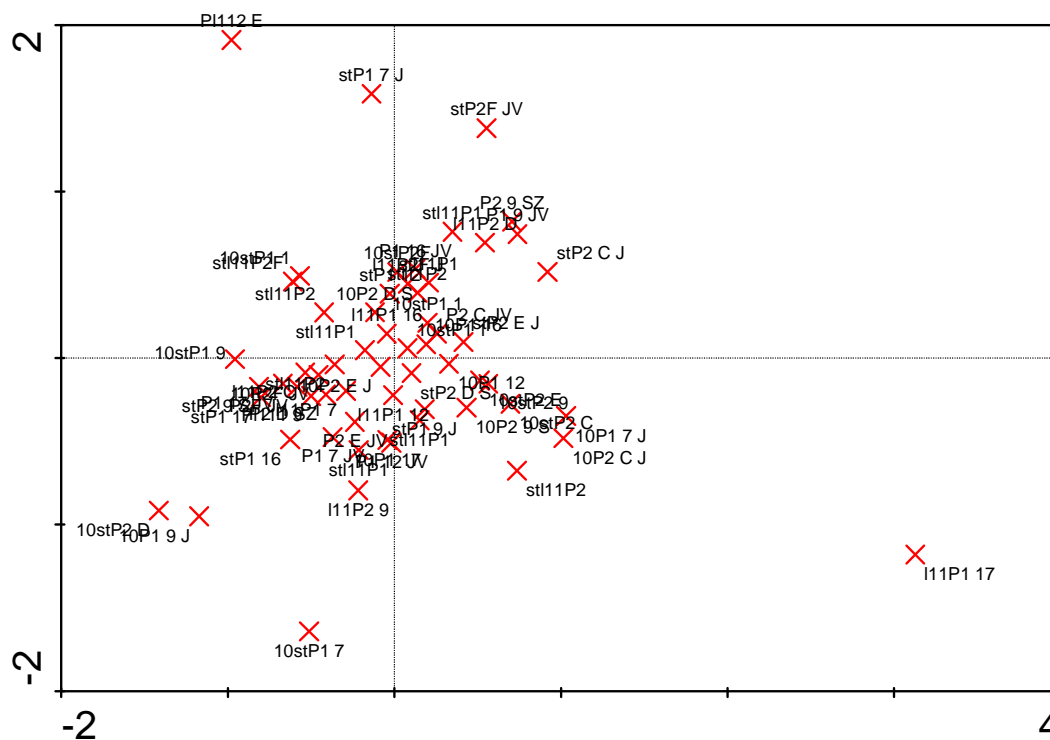


Obr. 4.21 Minoritní terpeny obsahově mezi 0-0,25 % plochy vybraných látek LÉTO 2011

Zastoupení minoritních terpenů obsahově mezi 0-0,25 % plochy vybraných látek ve vzorcích LÉTO 2011 je zobrazeno na obr. 4.21. Tyto látky se nevyskytují ve vzorcích z roku 2010 ani ve vzorcích JARO 2011. Mezi stresovanými a kontrolními stromy není statisticky významný rozdíl u žádné z uvedených minoritních látek.

## 4.7 Zpracování dat vícerozměrnou analýzou

Data byla zpracována PCA analýzou, která potvrdila, že rozdíly mezi stresovanými a kontrolními stromy nejsou průkazné. Výsledek PCA analýzy pro vzorky LÉTO 2011 je zobrazen na obrázku 4.22



Obr. 4.22 PCA analýza vzorků LÉTO 2011

Pokud by data byla rozdílná, získáme na obr. 4.22 dvě oddělené množiny. Hodnoty se však překrývají, což potvrzuje, že data rozdílná nejsou.

## 5 Diskuze

V analyzovaných vývrtech se nám podařilo identifikovat 37 monoterpenů a seskviterpenů. Jejich počet a identita je rozdílná od dosud publikovaných výsledků, které se analýzou těkavých látek pryskyřice zabývaly v minulosti. [60,61] Identifikace vyššího počtu látek se nám podařila díky použití citlivé GC×GC-TOFMS techniky. Tato technika umožňuje identifikaci velkého množství látek, které jednorozměrnou plynovou chromatografií není možné rozdělit a identifikovat. Důvodem je především odstranění koelucí a zlepšení citlivosti detekce po oddělení šumu pozadí od analyzovaných látek. To vede k získání mnohem lepších MS spekter i ve velmi malých koncentracích.

Variabilita mezi experimentálními stromy byla velmi vysoká. To je pravděpodobně dáno genetickou různorodostí zkoumaných stromů a jejich rozdílnou historií. Je známo, že složení pryskyřice, podobně jako letokruhy dřeva, odráží vliv působení všech druhů stresu, se kterými se stromům podařilo v průběhu života vyrovnat. Je také velmi pravděpodobné, že geneticky rozdílné stromy odpovídaly na různé stresy různě. Stresové faktory také pravděpodobně nebyly ve zkoumaných porostech homogenní, neboť jednotlivé stromy rostou sice v podobných, avšak mikroklimaticky rozdílných podmínkách.

Naše data ukazují, že složení těkavých látek vzrostlých smrků se po krátkodobém působení sucha kvantitativně ani kvalitativně nemění. Terénní pokusy ukázaly, že vyvolání vodního stresu vzrostlých stromů pouhým zastřešením jejich kořenů a odstíněním srážek nelze aplikovat, neboť stromy jsou schopny získávat vodu z okolí. Vodní hospodaření stromů bylo ovlivněno až po vybudování příkopu v roce 2011. Měření transpiračního proudu na vybraných stromech naznačují změny hospodaření s vodou už na jaře, údaje z dendrometrů to ale nepotvrzují. Signifikantní změny obou parametrů, tj. transpiračního proudu a objemů kmenů, byly pozorovány až v druhé polovině roku 2011. Ať došlo ke změnám hospodaření s vodou už na jaře, nebo až v průběhu léta, je zřejmé, že nedostatek vody byl relativně krátkodobý a tento krátkodobý stres se neprojevil ve složení těkavých látek pryskyřice. Bylo prokázáno, že vzrostlé stromy staré 80-100 let reagují na stres výrazně pomaleji než například malé semenáčky. [62] Z hlediska publikovaných údajů je stres trvajících po dobu jednoho až dvou měsíců nedostatečný k tomu, aby se u vzrostlých stromů výrazně změnily poměry

jednotlivých komponent pryskyřice. Studium vlivu sucha na smrk *Picea abies* se zabývali v minulosti (Turtola et al. 2003). Ti na semenáčcích smrku prokázali, že sucho zvyšuje koncentraci monoterpenů [62]. Podobná pozorování vlivu sucha na fyziologii stromů publikovali i jiní autoři. [63,65] Mimo jiné bylo zjištěno, že na rozdíl od semenáčků, vzrostlé stromy reagují na sucho mnohem pomaleji a změna složení pryskyřice se projeví až po déletrvajícím období sucha. Soudí se, že pro úspěšné napadení smrku lýkožroutem je nutný určitý stupeň oslabení. [66] Sucho je považováno za jeden z možných oslabujících faktorů. [67] Tím, že ovlivňuje množství uvolněných terpenů a jejich složení [68], může sucho iniciovat tvorbu nových terpenických látek, které mohou poskytovat vodítko k výběru vhodného stromu pro kolonizaci. Naše výsledky ukazují, že krátkodobé sucho takovou změnu u vzrostlých stromů nevyvolává.

V minulosti bylo problematice atraktivity stromů pro *I. typographus* věnováno hodně pozornosti [66]. Výsledkem mnoha experimentů, kdy se nepodařilo prokázat atraktivitu hlavních monoterpenů smrku pro *I. typographus* ani jejich synergický účinek na agregační feromony, je závěr, že *I. typographus* není k vhodnému hostiteli lákán prostřednictvím na dálku působících těkavých látek, ale že vyhledává strom vhodný ke kolonizaci víceméně náhodně během disperzního letu. [1,2] Naproti tomu je kůrovec atrahován k lapákům.

Odběr vzorků byl proveden ze vzrostlých stromů pomocí vývrtů. Vzrostlé stromy byly vybrány z toho důvodu, že právě do nich kůrovci nalétají. Vývrty byly zvoleny proto, že metoda zachytávání těkavých látek ze zvrásněné kůry je problematická, nepoškozené stromy totiž emitují velmi malá množství těkavých látek. Je-li kůra stromů členitá a není-li možné spolehlivě provést utěsnění prostoru, ze kterého se jímají látky na a emitované látky, je těžko rozeznatelné, zda-li zachycené látky pochází přímo z konkrétního stromu nebo z jeho okolí. Při volbě experimentálního přístupu jsme vycházeli z předpokladu, že ze stromu se odpařují pouze ty těkavé látky, které jsou uskladněné v pryskyřičných kanálcích pod kůrou.

Naše výsledky z analýzy GC-EAD prokázaly, že kůrovci jsou schopni vnímat velké množství komponent pryskyřice. Je zřejmé, že tyto komponenty mají potenciál ovlivňovat chování kůrovců při vyhledávání hostitele. GC-EAD analýzou emanací z lapáků se podařilo identifikovat nové antenálně aktivní látky, které ještě nebyly publikovány. Tyto látky (1,6-cineol, nonanal, *cis*-pinokamfon a terpinen-4-ol) se ovšem

nevyskytují mezi komponentami pryskyřice. Je pravděpodobné, že vznikají až po pokácení v průběhu uvadání stromu. K vysvětlení behaviorální funkce nově identifikovaných látek bude třeba provést řadu behaviorálních pozorování, protože aktivitu tykadel vyvolávají jak látky atraktivní, tak i repelentní. Také k vysvětlení vlivu sucha na atraktivitu pro kůrovce by bylo vhodné společně s těkavými látkami studovat i atraktivitu stromů pro kůrovce.

Projekt probíhající v Kostelci nad Černými lesy v porostu smrků nadále pokračuje. Složení těkavých látek pryskyřice ve vztahu k suchu bude pokračovat spolu se studiem změn atraktivity pro kůrovce. Je ovšem otázka, zda se případně změny vyvolané suchem podaří na vzrostlých stromech identifikovat. Jak již bylo uvedeno, variabilita složení byla u jednotlivých stromů vysoká. Ke zvýšení pravděpodobnosti nalezení rozdílů bylo vhodné uvážit případné navýšení počtu zkoumaných stromů. Alternativou je práce na geneticky jednotném materiálu a na experimentálně k tomu vytvořených plochách. Jedna i druhá varianta by vedla ke snížení variability vzorků, a tím ke zvýšení pravděpodobnosti detekce změn.



## 6 Závěr

Cílem práce bylo zjistit kvalitativní a kvantitativní rozdíly v obsahu těkavých látek u suchem stresovaných a kontrolních smrků a dále zjistit, zda-li jsou tyto změny vnímány kůrovci, a mohou tak ovlivnit jejich chování.

Výsledky prokázaly, že intenzivní krátkodobý stres nemá vliv na kvantitativní a kvalitativní složení těkavých látek u stromů starých 80-100 let, tudíž jsme nenalezli žádné indikátory krátkodobého vodního stresu. Na základě našich výsledků nemůžeme rozhodnout, zda se takové indikátory vodního stresu objeví u vzrostlých stromů při suchu dlouhotrvajícím.

Mezi těkavými látkami smrků bylo identifikováno celkem 37 monoterpenů a seskviterpenů. Ze všech těchto látek bylo 11 látek antenálně aktivních ( $\alpha$ -pinen, kamfen,  $\beta$ -pinen, myrcen,  $\Delta^3$ -karen, *p*-cymen, limonen,  $\beta$ -felandren, kafr, *trans*-pinokamfon a verbenon). V emanacích ze smrkového lapáku byly identifikovány tytéž látky a dále byly ještě nalezeny látky terpinen-4-ol, 1,6-cineol, nonanal a *cis*-pinokamfon. K prokázání vlivu antenálně aktivních látek na chování kůrovců je třeba uskutečnit další behaviorální experimenty.

## Seznam použité literatury

- [1] Byers, J.A.: Host tree chemismy affecting colononization in bark beetles. In: *Chemical Ecology of Insects 2*. Chapman and Hall, New York 1995, p.154-213
- [2] Schlyter,F.; Birgersson, G.; Byers, J.A.; Löfqvist, J.; Bergström,G: Field response of spruce bark beetle, *Ips typographus*, to aggregation feromone candidates. *Journal of Chemical Ecology* **13**,701-716 (1987)
- [3] Mustaparta, H: Chemoreception in the bark beetles of the genus *Ips*: synergism, inhibition and dicrimination of enenatiomers. In: *Odor Communication in Animals*. Elsevier, Amsterdam 1979, p. 147-158
- [4] Tommeras, B.A.; Mustaparta, H: Chemoreception of host volatiles in the bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Comparative Physiology A-Sensory, Neural and Behavioral Physiology* **161**:5, 705-710 (1987)
- [5] Eisner T.; Meinwald J.: *Chemical Ecology - The Chemistry of Biotic Interaction*, National Academy Press, Washington D.C. 1995
- [6] Nascimento, R.R.; Morgan E.D.: Chemicals involved in the comunication systém of social insect: Their source and methods of isolation and identification, with special emphasis on ants. *Química Nova* **19**, 156-165 (1996)
- [7] Pickett, J.A.; Bruce, T.J.A.; Chamberlain, K.; Hassanali, A.; Khan, Z.R. et al.: Plant volatiles yielding new ways to exploit plant defence. *Chemical Ecology* **16**, 161-173 (2006)
- [8] Harmatha J., Hertweck Ch., Chodounská H., Kasal A., Moravcová J., Piel J., Svatoš A., Valterová I., Žďárek J.: *Chemie a biochemie přírodních látek*, 27. svazek, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha 2002

- [9] Randuška D., Šomšák L., Háberová I.: *Barevný atlas rostlin*, 2. vydání, Bratislava, Obzor 1983
- [10] Biological library: Dostupné z URL: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id2371/> [cit. 7.3.2012]
- [11] Gilman, E.F. ; Watson, D.G.: Norway spruce (*Picea abies* L.). Fact Sheet ST- 448. Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida (1994)
- [12] Zeneli, G.: *The induced chemical defences of Norway Spruce (Picea abies (L.) Karst): Ecological fiction and regulation* – Dissertation, Jena (2006)
- [13] Bonello, P.; Gordon, T.R.; Herms, D.A.; Wood, D.L.; Erbilgin, N.: Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: A novel hypothesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**, 95-104 (2006)
- [14] Franceschi, V.R.; Krokene, P. ; Christiansen, E.; Krekling, T.: Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* **167**:2, 353–375 (2005)
- [15] Berryman, A.A.: Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus associations. *BioScience* **22**, 598-602 (1972)
- [16] Ruel, J.J.; Ayres, M.P.; Lorio P.L. Jr.: Loblolly pine responds to mechanical wounding with increased resin flow. *Canadian Journal of Forest Research* **28**:4, 596-602 (1998)
- [17] Lichtenthaler, H.K.: The stress concept in plants: An introduction, *Annals of the New York academy of science* **851**, 187-198 (1998)
- [18] Larcher W.: Stress in plants, *Naturwissenschaften* **74**, 158-167 (1987)

- [19] Rigling, A.; Bruhlhart, H.; Braker, O.U.; Forster, T.; Schweingruber, F.H.: Effects of irrigation on diameter growth and vertical resin duct production in *Pinus sylvestris* L. on dry sites in the central Alps, Switzerland. *Forest ecology and management* **175**, 285-296 (2003)
- [20] Tingey, D.T.; Manning, M.; Grothaus, L.C.; Burns, W.F.: Influence of light and temperature on monoterpene emission rates from slash pine. *Plant Physiology* **65**, 797–801 (1980)
- [21] Dudareva N.; Negre F.; Nagegowda, D.A.; Orlova, I.: Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 417–440 (2006)
- [22] Sharkey, T.D.; Yeh, S.S.: Isoprene emission from plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 407–436 (2001)
- [23] Holopainen, J.K.; Gershenzon, J., Multiple stress factors and the emission of plant VOCs, *Trends in plant science* **15**:3, 176–184 (2010)
- [24] Calogirou, A.; Larsen, B.R.; Kotzias, D.: Gas-phase terpene oxidation products: a review. *Atmospheric Environment* **33**:9, 1423–1439 (1999)
- [25] Kessler, A.; Baldwin, I.T.: Defensive function of herbivore induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**, 2141– 2144 (2001)
- [26] Turlings, T.C.J.; Tumlinson, J.H.; Lewis W.J.: Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**, 1251–1253 (1990)
- [27] Heil, M.; Silva Bueno, J.C.: Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5467–5472 (2007)
- [28] Lange, B.M.; Rujan, T.; Martin, W.; Croteau, R.: Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across

- genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13171-13177 (2000)
- [29] Phillips, M.A.; Croteau, R.B.: Resin-based defences in conifers, *Trends in plant science* **4**, 1360-1385 (1999)
- [30] Li, L.; Li, C.Y.; Lee, G.I.; Howe, G.A.: Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 6416–6421(2002)
- [31] Baldwin, I.T.; Halitschke, R.; Paschold, A.; von Dahl, C.C.; Preston, C.A.: Volatile signaling in plant–plant interactions: ‘Talking trees’ in the genomics era. *Science* **311**, 812–815 (2006)
- [32] ČZU - Studium a optimalizace skutečné efektivity obranných opatření proti lýkožroutu smrkovému v různých gradačních fázích  
<http://www.lykozrout.krajinari.com/lykozrout.php> [cit. 5.5.2012]
- [33] Biological library: Dostupné z URL: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id13972/> [cit. 5.5.2012]
- [34] Pfeffer A.: *Fauna ČSR - Kůrovci (Scolytoidea)*, svazek 6, Praha, Nakladatelství Československé akademie věd 1955.
- [35] *Ips typographus*: Dostupné z URL:  
<http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=72> [cit. 8.5.2012]
- [36] Zelený, J.; Doležal, P.; Kůrovcovití brouci (Scolytidae, Coleoptera) na smrku na Šumavě, *Aktuality šumavského výzkumu II*, 221-223 (2004)
- [37] Food and Agriculture Organization: Dostupné z URL:  
<http://www.fao.org/forestry/49410/en/svk/> [cit. 8.5.2012]
- [38] Zahradník, P.; Knížek, M.: *Lesnická práce* 4/2007

- [39] ŽP Vysočina: Dostupné z URL:  
<http://vysocina.lesnictvi.cz/materialy/lykozrout.htm> [cit. 8.5.2012]
- [40] Roldán-Gutiérrez, J.M.; Ruiz-Jiménez, J.; Luque de Castro, M.D.: Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. *Talanta* **75**, 1369–1375 (2008)
- [41] Eriksson, M.; Valterova, I.; Borg-Karlson, A.K.: Comparison of headspace techniques for sampling volatile natural products in a dynamic system, *Zeitschrift Fur Naturforschung - Journal of Biosciences* **55**:3-4, 180-188 (2000)
- [42] Chromservis: Dostupné z URL: <http://chromservis.cz/category/dynamic-headspace?lang=CZ> [cit. 8.5.2012]
- [43] Theodoridis, G.; Koster, E.H.M.; de Jong, G.J.: Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *Journal of Chromatography B* **745**, 49–82 (2000)
- [44] Dimandja, J-M. D.: Comprehensive 2-D GC provides high-performance separations in terms of selectivity, sensitivity, speed, and structure. *Analytical Chemistry* **76**:9, 167-174 (2004)
- [45] Philips, J.B.; Beens, J.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between two dimensions. *Journal of Chromatography A* **856**, 331–347 (1999)
- [46] Adahchour, M.; Beens, J.; Brinkman U.A.Th.: Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1186**, 67–108 (2008)
- [47] Břízová R.: Analýza samčího sexuálního feromonu *Anastrepha fraterculus*. Diplomová práce. Praha (2011)

- [48] Cai, J.; Lin P.; Zhu, X.; Su, Q.: Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC–FTIR and GC–MS. *Food chemistry* **99**, 401–407 (2006)
- [49] Nojima, S.; Kiemle, D.J.; Webster, F.X.; Apperson, C.S.; Schal, C.: Nanogram-Scale Preparation and NMR Analysis for Mass-Limited Small Volatile Compounds. *PLOS ONE* **6**:3, (2011)
- [50] Schneider, D.: Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo-und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* **40**, 8–41 (1957)
- [51] Myrick, A.J.; Baker, T.C.: Chopper-stabilized gas chromatography-electroantennography: Part I. Background, signal processing and example. *Biosensors and Bioelectronics* **31**, 197–204 (2011)
- [52] Byers J.A.: Equations for nickel–chromium wire heaters of column transfer lines in gas chromatographic–electroantennographic detection (GC–EAD). *Journal of Neuroscience Methods* **135**, 89–93 (2003)
- [53] ÚOCHB AV ČR: Dostupné z URL:  
<http://www.uochb.cz/web/structure/1141.html> [cit. 7.5.2012]
- [54] Muselík J.: Aplikace blízké infračervené spektroskopie ve farmaceutické analýze, *Chemické listy*, 106, 10–15 (2012)
- [55] Wilson, K.B.; Hanson, P.J.; Mulholland, P.J.; Baldocchi, D.D.; Wullschleger, S.D. : A comparison of methods for determining forest evapotranspiration and its components: sap-flow, soil water budget, eddy covariance and catchment water balance. *Agricultural and Forest Meteorology* **106**:2, 153–168 (2001)
- [56] Kalinová, B.; Břízová, R; Mašánková, K.; Zajíčková, L.; Nádraská, M.: *Biotic risks and climate change in forests*. Freiburg Self-publishing FVA 2011

- [57] LECO: Dostupné z URL:  
[http://www.leco.com/products/sep\\_sci/pegasus\\_4d/Pegasus4D.html](http://www.leco.com/products/sep_sci/pegasus_4d/Pegasus4D.html) [cit. 7.5.2012]
- [58] Martin D.; Tholl D.; Gershenzon, J.; Bohlman J.: Methyl Jasmonate Induces Traumatic Resin Ducts, Terpenoid Resin Biosynthesis, and Terpenoid Accumulation in Developing Xylem of Norway Spruce Stems. *Plant Physiology* **129**, 1003-1018 (2002)
- [59] Adams, R.P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Edition, Carol Stream, Allured Publishing Corporation 2007
- [60] Persson, M.; Sjödin, K.; Borg-Karlson K.A.; Norin, T.; Ekberg I.: Relative amounts and enantiometric compositions of monoterpene hydrocarbons in xylem and needles of *Picea abies*. *Phytochemistry* **42**:5. 1289-1297 (1996)
- [61] Martin, D.M.; Gerhenzon, J.; Bohlman, J.: Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce. *Plant Physiology* **132**, 1586-1599 (2003)
- [62] Turtola, S.; Manninen A.M.; Rikala R.; Kainulainen P.: Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots Pine and Norway Spruce seedlings. *Journal of Chemical Ecology* **29**:9, 1981-1995 (2003)
- [63] Hodges, J. D. ; Lorio, P. L.: Moisture stress and composition of xylem oleoresin in loblolly pine. *Forest Science* **21**, 283–290 (1975)
- [64] Major, E. J.: Water stress in Sitka spruce and its effect on the green spruce aphid *Elatobium abietinum*. In: *Population Dynamics of Forest Insects*. A. D. Watt, S. R. Leather, M. D. Hunter, and N. A. C. Kidd (Ed.). Andover Hampshire: Intercept, 1990, p. 85–93
- [65] Johnson, R. H.; Young, B. L.; Alstad, D. N.: Responses of ponderosa pine growth and volatile terpene concentrations to manipulation of soil, water, and sunlight availability. *Canadian Journal of Forest Research* **27**, 1794–1804 (1997)



- [66] Rudinsky, J.A.; Novak, V.; Svihra, P: Attraction of the bark beetle *Ips typographus* to terpenes and a male-produced pheromone. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* **67**, 179-188 (1971)
- [67] Christiansen, E.; Waring, R. H.; Berryman A.A.: Resistance of conifers to bark beetle attack: Searching for general relationships. *Forest Ecology and Management* **22**, 89–106 (1987)
- [68] Mattson, W.J.; Haack, R. A.: The role of drought stress in provoking outbreaks of phytophagous insects. In: *Insect Outbreaks*. P. Barbosa and J. C. Schultz. (Ed.). San Diego, California: Academic Press, 1987 p. 365–407

## **Přílohy**

Michaela Slušná<sup>[a,b]</sup>, Radka Břízová<sup>[a,c]</sup>, Lenka Zajíčková<sup>[d,e]</sup>,  
Blanka Kalinová<sup>[a,e]</sup>, Michal Hoskovec<sup>[a,e]</sup> a Marek Turčáni<sup>[e]</sup>

<sup>[a]</sup> Infochemikálie, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

<sup>[b]</sup> Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 6, 120 00 Praha 2

<sup>[c]</sup> Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT, Technická 5, 166 10 Praha 6

<sup>[d]</sup> Department of Biochemical Processes, Max Planck Institute of Biogeochemistry, D-07745 Jena, Německo

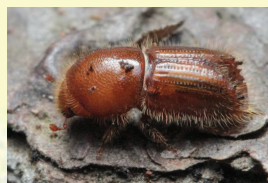
<sup>[e]</sup> Katedra ochrany lesa, Fakulta lesnická a dřevařská fakulta ČZU, Kamýcká 129, 166 21 Praha 6



Obr. 1: Vybrané plochy: Kostelec na Černými lesy



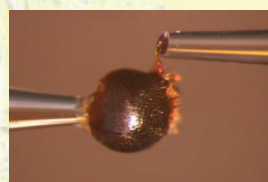
Obr. 2: Zastřešení ploch PE folií



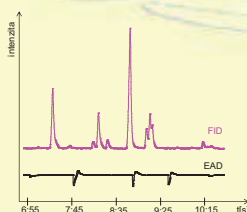
*Ips typographus*



Požerek *Ips typographus*



Obr. 3: Detail EAG pokusu



Obr. 4: Detail GC FID-EAD záznamu

## Úvod

Biogenní těkavé látky (BVOC) rostlin jsou sekundární metabolity, které se účastní mnoha ekologických interakcí. BVOC jsou součástí fyziologické odpovědi rostlin na stres. Sucho je považováno za hlavní faktor ovlivňující odolnost jehličnanů a mění tak produkci a složení BVOC uvolňovaných stromy a může ovlivňovat i rozhodování kůrovců při vyhledávání stromů pro kolonizaci. Proto studujeme působení sucha na obranyschopnost a atraktivitu vzrostlých smrků (*Picea abies*) pro kůrovce *Ips typographus*.

## Terénní experimenty

Experimenty byly založeny v roce 2010 v Kostelci nad Černými lesy. V porostu byly vybrány 2 dvojice ploch o velikosti 25×25 m (Obr. 1). V každé dvojici byla jedna plocha zastřešena PE folií (Obr. 2). Z 10 kontrolních (plochy KP1 a KP2) a 10 zastřešených stromů (plochy P1 a P2) byly odebrány vývrty (průměr 0,5 mm, délka 4 cm). Z každého vývrty bylo 200 mg rozdrceno a extrahováno MTBE. Vzorky byly analyzovány pomocí GC×GC-TOFMS a GC-FID-EAD. V roce 2011 bylo omezeno pronikání půdní vody z okolí vertikálně umístěnou PE folii dosahující do hloubky 50 cm.

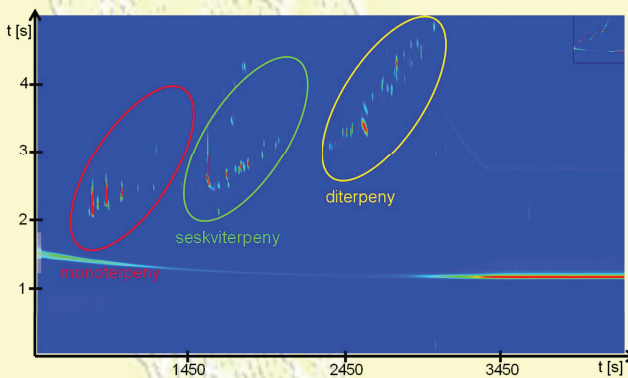
## Výsledky experimentů

Tykadlo *Ips typographus* reagovalo na některé těkavé látky uvolněné ze smrkového polena (Obr. 3). Srovnáním záznamů GC-FID-EAD a GC×GC-TOFMS byla zjištěna aktivita u následujících látek viz tabulka 1. Ne všechny látky identifikované v polenu byly identifikovány u vzrostlých stromů. U stresovaných stromů i kontrolních stromů z jara a podzimu 2011 bylo identifikováno 10 anténálně aktivních látek, které byly určeny na základě pokusu s GC-FID-EAD, detail viz obrázek 4. Z dvojrozměrného GC×GC záznamu těkavých látek polena byly jasně vymezené tři oblasti výskytu terpenů (monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny; viz Obr. 5). Při srovnání výskytu anténálně aktivních látek u stromů stresovaných na jaře a na podzim byl zjištěn statisticky významný rozdíl na hladině významnosti  $\alpha=0,05$  pouze u  $\beta$ -felandrenu, jehož výskyt je důkazem větší míry stresu (Obr. 6).

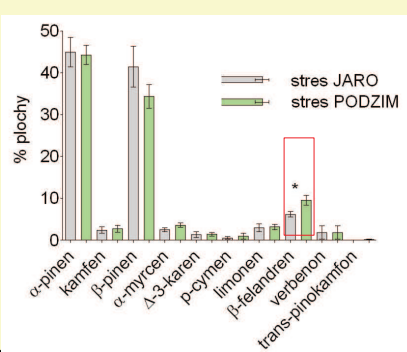
Analýza PCA ukazuje, že za největší rozdíly je zodpovědný právě  $\beta$ -felandren (PCA viz Obr. 7).

Tabulka 1: Anténálně aktivních látek nacházejících se v polenu a vzrostlých stromech

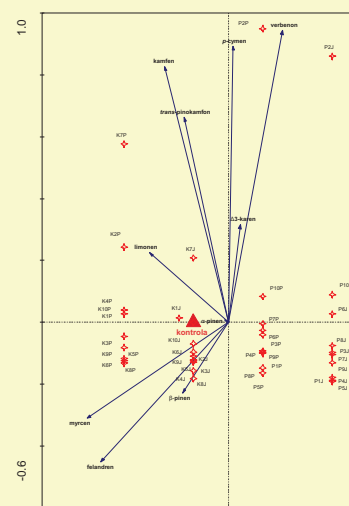
anténálně aktivní látka	$\alpha$ -pinen	kamfen	$\beta$ -pinen	$\alpha$ -myrcen	$\Delta^3$ -karen	p-cymen	limonen	terpinen-4-ol	1,6-cineol	nonanal	$\beta$ -felandren	verbenon	isopinokamfon	trans-pinokamfon	kafr
poleno	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
stromy z ploch	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x



Obr. 5: Složení BVOC emise polena



Obr. 6: Srovnání míry stresu (jaro / podzim)



Obr. 7: Analýza PCA